Herstellung von Anti-Lymphoblasten-Seren mit HL-A Gruppenspezifität

Konstanze Schäfer

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535722_0031

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Herstellung von Anti-Lymphoblasten-Seren mit HL-A Gruppenspezifität

Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Konstanze Schäfer
aus Altusried

Januar 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. F. Schwarzfischer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juli 1979

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
EINLEITUNG		1
1.	Haupthistokompatibilitätsantigene des Menschen	1
1.1.	Vorversuche bei der Spezies Maus	1
1.2.	Nachweis der menschlichen Leukozytenantigene	2
1.3.	Definition des HLA-Systems	2
1.4.	Vorkommen und Chemie der HLA-Antigene	4
2.	Serologischer Nachweis der HLA-Antigene	5
2.1.	Alloantiseren in der HLA-Serologie	5
2.2.	Probleme in der HLA-Serologie	5
2.3.	Methoden zur Gewinnung heterologer Anti-HLA-Antiseren	7
3.	Konzept der vorliegenden Arbeit	10
MATERIAL UND METHODEN		11
1.	Lymphoblastoide Zell-Linien	11
2.	Immunisierung der Kaninchen	13
3.	Absorption der Antiseren	13
4.	Fraktionierung und Reinigung der absorbierten Antiseren	15
5.	Präparation der Testzellen	16
6.	Der Mikrozytotoxizitätstest	17
7.	Auswertung der Testergebnisse	19
ERGEBNISTEIL		23
1.	Versuchsplan	23
2.	Vorversuche	26
2.1.	Antiserum 1	26

Seite

2.2. Antiserum 2 30
2.3. Antiserum 3 37
2.4. Antiserum 4 und 5 43
3. Heterologe Anti-HLA-B 12 - Antiseren 45
3.1. Antiserum 6 46
3.1.1. Analyse der Spezifität für HLA-A- und HLA-B-Eigenschaften 46
3.1.2. Analyse der Spezifität des Antiserums 6 in den Verdünnungsstufen 1:16, 1:32 und 1:64 59
3.1.3. Untersuchung des Antiserums 6 auf mögliche Spezifität für B-Zell-Eigenschaften 61
3.2. Antiserum 7 65
3.2.1. Analyse des Antiserums 7 auf Spezifität für HLA-A bzw. HLA-B - Eigenschaften 65
3.2.2. Analyse der Spezifität des Antiserums 7 in den Verdünnungsstufen 1:16, 1:32 und 1:64 73
3.2.3. Untersuchung der B-Zell-Spezifität 75
3.3. Vergleich von Antiserum 6 und 7 78

DISKUSSION 82

1. Spezifität der in den Vorversuchen analysierten, heterologen Anti-HLA-Antiseren 82
1.1. Antiserum 1 und 2 82
1.2. Antiserum 3 86
2. Spezifität der heterologen Anti-HLA-B 12 Antiseren 88
2.1. Biographie der Eigenschaft HLA-B 12 89
2.2. Antiserum 6 92
2.2.1. Spezifität des Antiserums 6 92

Seite

2.2.2. Reaktionsstärke und Titer des Antiserums 6 94
2.3. Antiserum 7 94
2.3.1. Spezifität des Antiserums 7 94
2.3.2. Reaktionsstärke und Titer des Antiserums 7 96
2.4. Vergleich Antiserum 6 und 7 97
2.4.1. Spezifität der Antiseren 6 und 7 100
2.4.2. Reaktionsstärke der Antiseren 6 und 7 102
2.4.3. Korrelation zwischen Antiserum 6 und 7 102
3. Möglichkeiten bei der Herstellung von heterologen Anti-HLA-Antiseren 103
3.1. Immunisierung der Kaninchen mit LCL-Zellen 104
3.2. Immunisierung mit LCL-Zellen 104
3.3. Absorption der heterologen Antiseren mit LCL-Zellen 106

ZUSAMMENFASSUNG 107

ANHANG 111

LITERATURVERZEICHNIS 119

Seite

2.2. Antiserum 2 30
2.3. Antiserum 3 37
2.4. Antiserum 4 und 5 43
3. Heterologe Anti-HLA-B 12 - Antiseren 45
3.1. Antiserum 6 46
3.1.1. Analyse der Spezifität für HLA-A- und HLA-B-Eigenschaften 46
3.1.2. Analyse der Spezifität des Antiserums 6 in den Verdünnungsstufen 1:16, 1:32 und 1:64 59
3.1.3. Untersuchung des Antiserums 6 auf mögliche Spezifität für B-Zell-Eigenschaften 61
3.2. Antiserum 7 65
3.2.1. Analyse des Antiserums 7 auf Spezifität für HLA-A bzw. HLA-B - Eigenschaften 65
3.2.2. Analyse der Spezifität des Antiserums 7 in den Verdünnungsstufen 1:16, 1:32 und 1:64 73
3.2.3. Untersuchung der B-Zell-Spezifität 75
3.3. Vergleich von Antiserum 6 und 7 78

DISKUSSION 82

1. Spezifität der in den Vorversuchen analysierten, heterologen Anti-HLA-Antiseren 82
1.1. Antiserum 1 und 2 82
1.2. Antiserum 3 86
2. Spezifität der heterologen Anti-HLA-B 12 Antiseren 88
2.1. Biographie der Eigenschaft HLA-B 12 89
2.2. Antiserum 6 92
2.2.1. Spezifität des Antiserums 6 92

Seite

2.2.2. Reaktionsstärke und Titer des Antiserums 6 94
2.3. Antiserum 7 94
2.3.1. Spezifität des Antiserums 7 94
2.3.2. Reaktionsstärke und Titer des Antiserums 7 96
2.4. Vergleich Antiserum 6 und 7 97
2.4.1. Spezifität der Antiseren 6 und 7 100
2.4.2. Reaktionsstärke der Antiseren 6 und 7 102
2.4.3. Korrelation zwischen Antiserum 6 und 7 102
3. Möglichkeiten bei der Herstellung von heterologen Anti-HLA-Antiseren 103
3.1. Immunisierung der Kaninchen mit LCL-Zellen 104
3.2. Immunisierung mit LCL-Zellen 104
3.3. Absorption der heterologen Antiseren mit LCL-Zellen 106

ZUSAMMENFASSUNG 107

ANHANG 111

LITERATURVERZEICHNIS 119

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

EBV	Epstein Barr Virus
FOUR-Serie	Leukozytenantigene des HLA-B-Locus
H-2	System der Histokompatibilitäts-Antigene bei der Spezies Maus
HLA	Human leucocyte antigens des HLA-A-Locus
Hu-1	ehemalige Bezeichnung für das HLA-System
Ia oder Ir - Antigene	Immune associated oder Immune response-Antigene
IFH	Institut für Hämatologie
LA-Serie	Leukozytenantigene des HLA-A-Locus
LD-Serie	Lymphocyte detected antigens
LCL	Lymphoblastoid cell lines
MHC	Major histocompatibility complex
MLC	Mixed lymphocyte culture
NIH	National Institut of Health
PBL	Periphere Blut-Lymphozyten
RPMI	Roswell Memorial Park Institut
SD-Serie	Serologically defined antigens
WHO	World Health Organization

Mein Dank gilt allen, die mir die vorliegende Arbeit ermöglicht haben.
Für die Überlassung des Themas und Beratung:
Herrn Prof. Dr. S. Thierfelder
Herrn Dr. med. habil. H. Rodt
Institut für Hämatologie der GSF, Abteilung Immunologie
Herrn Prof. Dr. Dr. F. Schwarzfischer
Institut für Anthropologie und Humangenetik, Universität München

Für die HLA-Typisierung der Testzellen mit Alloantiseren und z.T. Mitaustestung der heterologen Antiseren:
Herrn Privatdozent Dr. E. Albert
und seinen Mitarbeitern
Labor für Gewebetypisierung, Kinderpoliklinik Universität München

Für Diskussionen und gute Atmosphäre im Labor:
Frau Dr. G. Jäger
Frau H. Kriegeskorte
Frau K. Oettrich
Frau Dr. K. Pachmann
Frau G. Weber
Frau Dr. J. Gabrilovac
Frau S. Trimborn

Für die Möglichkeit, die statistische Auswertung der Untersuchungen mit EDV durchzuführen:
Frau J. Baumann
Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathematik, Klinikum Großhadern Universität München

Allen Angehörigen des Institutes für Hämatologie für zahlreiche fruchtbare Interaktionen.

EINLEITUNG

1. Haupthistokompatibilitätsantigene des Menschen

Das HLA-System (Human Leucocyte Antigens des Genortes A), das zum MHC (Major Histocompatibility Complex) gehört, ist ein gentisch differenzierbarer Bereich auf dem menschlichen Chromosom Nr. 6 (1, 2). Die Genprodukte dieser Region sind Zelloberflächen-Determinanten, die bei der Immunantwort als Erkennungsstrukturen für das "Selbst" (3) fungieren (5, 6, 7). Das HLA-System ist auch bei der Regulation der Immunantwort beteiligt (8, 9, 10).

1.1. Vorversuche bei der Spezies Maus

Wegweisend für das derzeitige Modell und Verständnis des HLA-Systems waren Transplantationsversuche von LITTLE, GORER, MEDAWAR und SNELL an Mäusen (11). LITTLE verwendete 1914 erstmals Inzucht-Mäusestämme für Tumor-Transplantationen (12). Diese Versuche ermöglichten die Interpretation der Transplantationsbiologie auf genetischer Grundlage: Syngen transplantierte Tumoren (von Tieren aus dem gleichen Inzucht-Stamm) wuchsen an; allogen verpflanzte Tumoren (von Tieren eines anderen Inzucht-Stammes) wurden abgestoßen. Tumoren, die von parentalen Stämmen auf ihre F_1-Hybride transplantiert wurden, wuchsen an, nicht jedoch, wenn die Transplantation in umgekehrter Richtung durchgeführt wurde.

1936 gelang es GORER bei der Maus vier Blutgruppenantigene, darunter das Antigen II, nachzuweisen. GORER und SNELL bezeichneten das Gen für das Antigen II als Histocompatibility-2 (H-2). Mit Hilfe von histogenetischen Methoden konnte SNELL eine Reihe weiterer Allele der H-2 Region definieren (13).

1.2. Nachweis der menschlichen Leukozytenantigene

Das Interesse an den menschlichen Leukozytenantigenen rückte in den Mittelpunkt der Untersuchungen, als man diesen Strukturen eine mögliche Beteiligung an der Leukopenie bzw. Leukämie zuschrieb (14). Bei leukämischen und hypoplastischen Patienten wurden im Serum Antikörper gefunden (15), die als Nebenwirkungen wiederholt erfolgter Bluttransfusionen erkannt wurden (16). So fand DAUSSET heraus, daß transfundierte Personen Antikörper gegen bestimmte Antigene der Leukozyten bilden (17). Er verglich daraufhin die Reaktionsmuster verschiedener Antiseren, die im Agglutinationstest mit einer Reihe von Spenderzellen untersucht worden waren. Dabei ergab es sich, daß eine Gruppe von Seren mit den gleichen Zellen eines Probanden positiv waren. Das mit diesen Antiseren identifizierte Antigen wurde "Mac" genannt.

1.3. Definition des HLA-Systems

1962 stellte van ROOD erstmals die These auf, daß sich die Leukozytenantigene aus einer Gruppe von zwei Spezifitäten, 4a und 4b (FOUR), zusammensetzen, die von einem Genort aus kontrolliert werden (18). Dieses diallele System basierte auf der Berechnung von Ähnlichkeiten der Antiseren. An Hand von Familienstudien konnte gezeigt werden, daß die Eigenschaften 4a und 4b negativ korreliert sind.

PAYNE und Mitarbeiter wiesen eine weitere Gruppe der Leukozytenantigene nach, die sie LA-Serie nannten (19). Den Zusammenhang zwischen den beiden Gruppen, FOUR und LA, legten DAUSSET und IVANYI an Populationsstudien

dar (20). Sie postulierten, daß jedes der 10 damals bestimmbaren Antigene unter der Kontrolle eines gemeinsamen genetischen Ortes stünden, dem Hu-1-Komplex, der später HLA-System genannt wurde.

Segregationsstudien an Familien ergaben, daß nie zwei Antigene einer Serie durch einen Elternteil vererbt werden (22). Damit war auch der Beweis erbracht, daß die beiden Gruppen, LA und FOUR, Produkte von Allelen sind, die auf zwei eng aufeinander folgenden Orten, HLA-A und HLA-B, eines Chromosoms kodiert werden (21, 22, 23).

1970 wurde von der Arbeitsgruppe von KISSMEYER-NIELSEN und THORSBY ein weiterer Genort, HLA-C, zur Diskussion gestellt (24). LÖW (25) berichtete von einer Familie mit einem Crossing-Over zwischen dem HLA-C und dem HLA-B-Ort. Damit konnte der HLA-C-Genort innerhalb der HLA-Region festgelegt werden.

Die Genprodukte des HLA-A, -B und -C-Genortes gehören zu den klassischen HLA-Antigenen, die auch S D (Serologically Defined)-Antigene genannt werden. Die L D (Lymphocyte Defined)-Antigene, Genprodukte des HLA-D-Genortes, konnten in der MLC (Mixed Leucocyte Culture)-Testung durch Kokultivierung immunkompetenter Lymphozyten identifiziert werden (26, 27, 28, 29, 30). Bei diesen Studien fielen Kombinationen auf, die identische S D-Eigenschaften hatten und in der MLC sich gegenseitig zur Blastenbildung stimulierten. Dieser zunächst widersprüchliche Befund führte zu der Annahme, daß ein weiterer HLA-Genort existiert, dessen Genprodukte für die MLC-Reaktion zuständig sind und serologisch nicht erfaßt werden können.

1.4. Vorkommen und Chemie der HLA-Antigene

Die Produkte des HLA-A, -B und C-Ortes haben die Eigenschaften von Glykoproteinen und kommen auf der Plasmamembran aller kernhaltigen Zellen und auf Spermien vor. Die HLA-D-Determinanten konnten bisher nur auf den aus dem Knochenmark stammenden B-Lymphozyten, den Makrophagen, Endozellen und auf Spermien nachgewiesen werden. Ungebundene HLA-Moleküle können aus Serum und Urin isoliert werden (31).

Durch den Einsatz von proteolytischen Enzymen und nichtionischen Detergentien war es möglich, zwei Komponenten der S D-Antigene zu unterscheiden, die miteinander in nicht-kovalenter Bindung korrespondieren (32).

Die kleinere Untereinheit, ß-2 Mikroglobulin, ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 12 000 Dalton (33). 30% der Aminosäurensequenz sind homolog zu den schweren Ketten der Immunglobuline (34). Im Gegensatz zu den HLA-Determinanten wird ß-2 Mikroglobulin auf dem Chromosom 15 kodiert (35).

Die größere, polymorphe Peptidkette ist glykosyliert und hat je nach der Präparationsmethode ein Molekulargewicht von 48 000 Dalton (Detergentien) bzw. von 35 000 Dalton (Proteolyse). Die LD-Antigene bestehen nur aus der schweren Polypeptidkette (36). Sequenzierungen dieser Ketten ergaben, daß die HLA-Spezifitäten auf minimalen Änderungen in der Aminosäurenfolge, an etwa 20 bis 30 Positionen, beruhen (37). Die HLA-Spezifitäten können möglicherweise auch auf Unterschiede in der Tertiärstruktur zurückzuführen sein (14).

2. Serologischer Nachweis der HLA-Antigene

2.1. Alloantiseren in der HLA-Serologie

Seit den Veröffentlichungen von PAYNE (38) und van ROOD (39), die über die Bildung von Alloantikörpern während der Schwangerschaft berichteten, wurden zur Typisierung der HLA-Antigene vorwiegend Seren von Schwangeren verwendet. Etwa ein Drittel der Schwangeren (40) bilden zytotoxische Antikörper, die gegen die väterlichen HLA-Antigene des Kindes gerichtet sind. Es wird auch von Seren berichtet, die frei von zytotoxischen Antikörpern sind, die jedoch die MLC-Reaktion hemmen können. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Antikörper, die gegen LD-Eigenschaften entstanden sind (41, 42).

2.2. Probleme in der HLA-Serologie

Da die serologische Analyse der HLA-Antigene auf relativ genau definierbare Antiseren angewiesen ist, hängt die Qualität eines Antiserums in erster Linie von seiner Spezifität für bestimmbare Eigenschaften ab. Im Idealfall reagiert das Antiserum nur mit einer bestimmten Antigeneigenschaft, d.h. es ist monospezifisch. Die Erfahrungen mit Alloantiseren zeigten jedoch, daß auch bei gezielter Immunisierung von Freiwilligen diese Serumqualität meist nicht erreicht werden kann (43).

Vielmehr reagieren die Alloantiseren mit verschiedenen Spezifitäten innerhalb der vier HLA-Antigenserien. Diese Kreuzreaktionen stellen ein zentrales Problem in der HLA-Serologie dar (44, 45, 46).

Als Ursachen dafür werden folgende Möglichkeiten diskutiert:
das Antiserum enthält mehrere Spezifitäten gegen verschiedene HLA-Antigene, d.h. es ist multispezifisch (subtypische Antikörper), oder
das Antiserum besteht aus multivalenten Antikörpern, die mit einer Gruppe phylogenetisch eng verwandter HLA-Antigene reagieren können (supertypische Antikörper), oder im Antiserum befindet sich eine Mischung aus sub- und supertypischen Antikörpern (5).

Kreuzreaktionen können auch als Folge von Interaktionen und/oder Konkurrenzverhalten von nicht-allelen HLA- und von nicht-HLA-Antigenen serologisch manifest werden (47). Die Komplexizität der Kreuzreaktionen erschwert vielfach die Analyse und Interpretation der Spezifität von Anti-HLA-Antiseren.

In den genannten Fällen können durch Absorption des Antiserums die Kreuzreaktionen eingeschränkt werden. Man spricht dann von "operationell" monospezifischen bzw. oligospezifischen Antiseren. Bei dieser Manipulation verlieren die Antiseren allerdings an Aktivität. Die Titer im Komplement abhängigen Zytotoxizitätstest liegen im Bereich von 1:2 und 1:8 der Serumverdünnungen (48).

Nach wie vor besteht für die HLA-Typisierung Bedarf an spezifischen Antiseren, die in hoher Verdünnung noch starke und vollständige Reaktionen mit den bereits bekannten HLA-Antigenen hervorrufen. Außerdem werden qualifizierte Antiseren für die serologische Charakterisierung der noch nicht klassifizierten Genprodukte des MHC benötigt.

2.3. Methoden zur Gewinnung heterologer Anti-HLA-Antiseren

Heterologe Antiseren, die durch Immunisierung von Kaninchen mit menschlichen Erythrozyten produziert worden waren, erwiesen sich bereits bei der Identifizierung der menschlichen Blutgruppenantigene als ausgezeichnete Indikatorseren. Auch die Eigenschaften des MN- und P-Systems und der Rhesusfaktor konnten auf Grund von heterologen Antiseren deduziert und differenziert werden (49, 50).

Heterologe Anti-HLA Antiseren werden vorwiegend durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen.

BRUTEL et al. (51) verglichen die Antikörperproduktion bei Ziegen, Kaninchen, Hühnern, Meerschweinchen und Ratten nach Immunisierung mit menschlichen Blutzellen. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß Kaninchen am besten für die heterologe Immunisierung geeignet sind.

Sehr gute Ergebnisse konnten auch bei der Hyperimmunisierung von Affen erzielt werden. In zwei Fällen waren die produzierten Affen-Anti-HLA-Antiseren hochtitrig und spezifisch (52, 53).

Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Gewinnung von heterologen Anti-HLA-Antiseren unterscheiden sich in:

1. der Wahl des Immunogens,
2. der Präparation des Immunogens und
3. der Präparation des Antiserums (Tabelle 1).

Tabelle 1

Methoden zur Herstellung heterologer Anti-HLA-Antiseren

1. Wahl des Immunogens:	a) Milz (54) b) periphere Blutlymphozyten (55, 56) c) Lymphoblastoide Zell-Linien (57 - 64) d) HLA-Antigene aus Serum (65, 66, 67, 68) e) HLA-Antigene aus Urin (31)
2. Präparation des Immunogens:	a) Isolierung der HLA-Moleküle aus Membranfraktionen von - Milz: Papain-Proteolyse (54) - LCL: Proteolyse (57, 60, 62, 63, 64) - LCL: KCL-Extraktion (58, 59) b) Rohextrakt von LCL (61) c) keine Manipulation (55)
3. Präparation des Antiserums:	a) Absorption mit PBL (55, 62, 68) - mit Erythrozyten (67) - mit LCL (57, 58, 67) - mit gereinigten LCL (63) - mit Serum (65, 67) - mit HLA-Antigenen aus Serum, an Immunadsorbens gebunden (68) b) keine Manipulation (59, 60, 61, 64, 66)

Bei der heterologen Immunisierung entstehen neben den HLA-spezifischen auch unspezifische Antikörper, die gegen alle Molekülstrukturen des Immunogens gerichtet sind, die von der immunisierten Spezies als fremd erkannt werden. In einem heterologen Anti-HLA-Antiserum können also sog. spezies-spezifische Antikörper die HLA-spezifische Antikörper-Aktivität maskieren (68).

Erst die Absorption des Antiserums mit Zellen oder mit gereinigten Membranfraktionen ermöglicht eine Unterscheidung zwischen HLA-spezifischen und -unspezifischen Reaktionen des Antiserums.

Erste Versuche zur Herstellung heterologer Anti-HLA-Antiseren (54, 56) ergaben, daß die Antiseren nach Absorption keine HLA-spezifischen Antikörper mehr aufwiesen. Um zu vermeiden, daß das Immunogen mit nicht-HLA-Determinanten kontaminiert ist, ging man dazu über, hochgereinigte HLA-Antigene bei der Immunisierung zu verwenden.

Die Möglichkeit, aus lymphoblastoiden Zellinien-Zellen HLA-Antigene anzureichern (57, 58, 59, 60, 62, 63, 64) war ein wichtiger Schritt in der HLA-Serologie.

Eine weitere Quelle für HLA-Antigene sind die im Serum und Urin ungebunden vorkommenden HLA-Antigene (31, 65, 66, 67, 68).

Ein von FERRONE et al. beschriebenes Anti-W 24-Antiserum entstand durch heterologe Immunisierung mit aus Serum isolierten HLA-Antigenen (66). Dieses Antiserum ist bisher das einzige heterologe Antiserum, das von der NIH-Serumbank als Referenzserum für die HLA-Typisierung aufgenommen wurde.

3. Konzept der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit dokumentiert die Herstellung und Untersuchung heterologer Anti-HLA-Antiseren, die durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen wurden.

Neu an den vorliegenden Beispielen ist, daß sowohl zur Immunisierung als auch zur Absorption der Antiseren lymphoblastoide Zellinien eingesetzt wurden, die in vitro kultiviert wurden.

Zur Immunisierung und zur Absorption wurden verschiedene Kombinantionen von LCL gewählt. Immunisiert wurde u.a. mit LCL, die im HLA-Phänotyp homozygot waren.

Die LCL, die zur Absorption verwendet wurde, hatte jeweils nur eine HLA-Determinante mit dem Immunogen gemeinsam.

Die Austestung der Antiseren erfolgte im Mikrozytotoxizitäts-Test gegen periphere Lymphozyten von HLA-typisierten Blutspendern und gegen HLA-typisierte lymphoblastoide Zellinien.

Zur Analyse der Spezifität der Antiseren wurden die Untersuchungsergebnisse statistisch und graphisch ausgewertet.

MATERIAL UND METHODEN

1. Lymphoblastoide Zell-Linien

Zur Herstellung der heterologen Anti-HLA-Antiseren wurden lymphoblastoide Zell-Linien (LCL) verwendet, die von Dr. NETZEL am Institut für Hämatologie (IFH) etabliert wurden (Tabelle 2).

Die LCL wurden durch Infektion von normalen Blutlymphozyten mit Epstein-Barr-Virus von B 95-8 Kulturen angezüchtet (69).

LCL wachsen als Suspensionskulturen in Plastik- (250 ml) oder Glasflaschen (1000 - 2000 ml).

Die Kulturen in den größeren Flaschen müssen für einen optimalen Austausch von Stoffwechselprodukten mit dem Magnetrührer oder durch einen Rotor bewegt werden.

Kulturbedingungen für die Passagierung:
Medium: RPMI 1640 mit 10% inaktiviertem fötalen Kälberserum und Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (50 µg/ml).
Temperatur: 37°C
pH: 7 - 7,4
Zelldichte: 0,5 - 1,5 x 10^6/ml
Vitalität der Zellen: 70 - 100%

Die Vitalität der Zellen kann im Trypan-Ausschlußtest ermittelt werden.

Tabelle 2

Lymphoblastoide Zell-Linien des IFH.
Ihre Verwendung bei der Immunisierung (a), Absorption (b) und Testung der Antiseren (c).

LCL	HLA-A und -B	HLA-D	Verwendung
IFH- 1	2 8 W 35	DW 3	c
IFH- 2	3-7/3-7	DW 2/DW 2	c
IFH- 3	2 3 7 40	DW 2	c
IFH- 4	1-8/1-8	DW 3/DW 3	c
IFH- 5	2-12/2-12	DW 6	c
IFH- 6	1-8/1-8	DW 3/DW 3	c
IFH- 7	3-18/3-18		c
IFH- 8	10-W 16/3-W 21		c
IFH-10	2-12/2-12	DW 2/DW 2	a,b,c
IFH-13	2- 40/2- 40	REB/REB	c
IFH-14	3-W 35/2- 15	DW 2	a,c
IFH-15	2-12/2-12		c
IFH-16	29-12/2-12	DW 7	a,b,c
IFH-17	2- 15/2- 15		a,c
IFH-18	3-W 35/2- 15		b,c
IFH-19	3-7/10-18	DW 2/DW 2	c
IFH-20	3-W 35/3-W 35	DW 1/DW 1	c
IFH-21	2-17/2-17		c
IFH-22	W 25-12/1-8		c
IFH-23	W 25-12/1-8		c
IFH-25	11-W 35/2-18	DW 1	c
IFH-27	9-W 35/11-W 35	DW 1/DW 1	c
IFH-28	9-W 35/11-W 35	DW 1/DW 1	c

2. Immunisierung der Kaninchen

Jeweils sechs Kaninchen wurden mit den in Tabelle 2 aufgeführten LCL immunisiert. Bei der Immunisierung wurde nach folgendem Schema vorgegangen:

Erstimmunisierung: Jedem Kaninchen wurden 100 x 10^6 LCL-Zellen in 2,5 ml Medium - in diesem Fall Hank'sche Lösung oder L-15-Medium - an drei Stellen, an den Pfoten und im Nacken, subkutan injiziert.

Boosterung: 14 Tage nach der Erstimmunisierung wurden den Tieren an drei aufeinander folgenden Tagen 3 x 100 x 10^6 Zellen in 3 ml Medium i.v. injiziert. Am 23. Tag erfolgte nochmals eine Injektion mit 100 x 10^6 Zellen/3 ml Medium i.v.

Entbluten der Kaninchen: 7 Tage nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen entblutet. Die Seren wurden abzentrifugiert, nach der Titerbestimmung in der Komplementbindungsreaktion gepoolt und bei -20°C gelagert.

3. Absorption der Antiseren

Die Absorption der Antiseren erfolgte nach der Methode von GÖTZE und REISFELD (127).

Zur Absorption wurden lymphoblastoide Zellen verwendet, die der laufenden Kultur frisch entnommen wurden und solche, die bereits bei -20°C gelagert worden waren.

Die lymphoblastoiden Zellen wurden in Kulturmedium gewaschen, indem sie zweimal bei 1000 g 10 Minuten lang zentrifugiert wurden und der Überstand verworfen wurde.

Die sedimentierten Zellen wurden dann in Medium resuspendiert und auf drei Beckman-Mikrozentrifugenröhrchen aufgeteilt. Das Medium wurde nach der Zentrifugation in der Beckman Zentrifuge (5 Min., 2000 g) mit einer Pasteurpipette abgehoben.

Die Zellen wurden dann mit dem Antiserum in dem Verhältnis 1:2 (g/ml) gemischt. Die Antiseren wurden jeweils dreimal mit den suspendierten Zellen 30 Minuten lang bei 4°C inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Zellen durch wiederholtes Schütteln in Suspension gehalten. Nach jedem Absorptionsschritt wurde das Antiserum bei 5000 g in der Beckman Zentrifuge abzentrifugiert und mit einer Pasteurpipette in das nächst folgende Mikroröhrchen mit den vorbereiteten Zellen transferiert.

Die Absorption wurde wiederholt, wenn das absorbierte Antiserum im Mikrozytotoxizitäts-Test noch Aktivität gegenüber den zur Absorption verwendeten LCL aufwies. Nach der Absorption wurden die Antiseren bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Antiseren 6 und 7 wurden auch auf B-Zell-spezifische-Antikörper untersucht. Dazu wurden sie zusätzlich mit Thrombozyten absorbiert.

Absorption mit Thrombozyten:
Die Thrombozyten von gepoolten Blutkonserven (Blutbank, München) wurden nach der Isolierung mit physiologischer NaCl-Lösung ausgewaschen und durch Zentrifugation in Beckman-Mikrozentrifugenröhrchen sedimentiert (40 Min., 2500 U).

Die Thrombozyten wurden dann mit dem Antiserum im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Suspension wurde 1-2 Stunden bei Zimmertemperatur und mehrere Stunden bei 4°C inkubiert.

Danach wurde das Antiserum abzentrifugiert (30 Min., 2500 U) und erneut mit Thrombozyten inkubiert.

4. Fraktionierung und Reinigung der absorbierten Antiseren

Im Anschluß an die Absorption wurden die Antiseren durch eine Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Zellulose zu IgG fraktioniert und dabei von antikomplementären Komplexen, die während der Absorption entstehen, befreit.

Als Säule diente eine mit DEAE-Zellulose (DE-52, Whatman) gepackte Pasteurpipette (0,6 x 8 cm).

Die Äquilibrierung des Austauschers erfolgte mit einem 0,02 M Phosphatpuffer, pH 8.

Vor der Chromatographie wurden die Antiseren mehrere Stunden bei 4°C gegen den Phosphatpuffer dialysiert.

Die Trennung wurde nach der Methode des "Start-Puffer-Eluierens" durchgeführt. D.h. für die Elution wird der gleiche Puffer wie zum Äquilibrieren der Säule und zur Probenmischung verwendet. Bei diesem Verfahren erscheint die IgG-Fraktion nach dem Durchlauf des Totvolumens.

Die IgG-Fraktionen wurden im Minicon-Ultrafiltrationsgerät auf ca. 10 mg/ml konzentriert.

5. Präparation der Testzellen

Isolierung der Lymphozyten aus peripherem Blut:
Die Separation der Lymphozyten aus peripherem Blut erfolgte mit Hilfe der Ficoll-Isopaque-Technik (70).
10 ml Heparinblut wurden mit 0,9%iger NaCl-Lösung im Verhältnis 1:3 verdünnt. Die Ficoll-Isopaque Lösung wurde mit dem verdünnten Blut überschichtet und anschließend 20 Minuten bei 1000 g zentrifugiert.

Bei der Zentrifugation bilden sich zwei Fraktionen der Blutzellen aus: In der Interphase befinden sich die Lymphozyten, die schweren Erythrozyten und Granulozyten setzen sich am Boden des Zentrifugenröhrchens ab.

Die Lymphozyten wurden aus dem Interphasenring abgehoben und zweimal mit Hank'scher Lösung durch Zentrifugation (10 Minuten bei 400 g) gewaschen.

Anreicherung der B-Lymphozyten:
Zur Anreicherung der B-Lymphozyten wurde die Spontanrosetten-Technik verwendet (71). Dieser Methode liegt das Phänomen zu Grunde, daß T-Lymphozyten durch Inkubation mit Schafserythrozyten Rosetten bilden. Die T-Zell-Rosetten können dann durch die Ficoll-Gradienten-Zentrifugation von den B-Lymphozyten getrennt werden.

Präparation der Schafserythrozyten:
Die Hammelerythrozyten wurden zweimal mit physiologischer NaCl-Lösung durch Zentrifugation bei 650 g, 7 Minuten lang, gewaschen und in RPMI-1640 Medium resuspendiert.

Daraufhin wurden die Hammelerythrozyten mit Neuraminidase inkubiert. Nach der Zentrifugation und dem zweimaligen Waschen mit physiologischer NaCl-Lösung wurden die mit

Neuraminidase behandelten Schafserythrozyten in RPMI-1640 Medium aufgenommen.

Rosettenbildung der T-Lymphozyten und Abtrennung der B-Lymphozyten:
Die peripheren Blutlymphozyten (PBL) wurden im Verhältnis 1:1 mit den Neuraminidase behandelten Schafserythrozyten gemischt und über Ficoll-Isopaque geschichtet. Die Rosettierung findet während der Inkubation bei 5°C statt, die 30 Minuten lang durchgeführt wird. Anschliessend wurden die rosettierten T-Lymphozyten durch Zentrifugation, 10 Minuten bei 650 g, sedimentiert.

Die B-Lymphozyten befinden sich in der Interphase und können isoliert und gewaschen werden.

6. Der Mikrozytotoxizitätstest

Der Komplement abhängige Mikrozytotoxizitätstest (72) ist inzwischen zum Standardtest für die HLA-Typisierung geworden.

Im Mikrozytotoxizitätstest wird der zytotoxische Effekt von Antikörpern in Gegenwart von Komplement auf Testzellen untersucht. Sind in einem Antiserum Antikörper enthalten, die mit Antigenen auf der Zelloberfläche reagieren können, so erfolgt in Gegenwart von Komplement eine Lyse der mit Antikörpern besetzten Testzellen. Die lysierten Zellen nehmen durch die defekte Membran Farbstoff, z.B. Eosin, ins Zytoplasma auf. So können tote Zellen im Phasenkontrastmikroskop erkannt werden. Als Ergebnis wird das Verhältnis von toten zu lebenden Zellen angegeben.

Voraussetzungen für die Durchführbarkeit des Testes sind eine 90-100%ige Vitalität der Testzellen und die Verwendung von Kaninchen-Komplement ohne natürliche Zytotoxizität gegenüber den Testzellen. Um falsch negative bzw. falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, muß daher das als Komplement benutzte Kaninchenserum vorher auf etwaige Zytotoxizität geprüft werden.

Für den Mikrozytotoxizitätstest sind sog. Terasaki-Plastik-Platten mit Vertiefungen für das Reaktionsgemisch vorgesehen (72).

Der Test wird im einzelnen folgendermaßen durchgeführt: Mit einem Hamilton-Dispenser wird 1 µl der jeweiligen Antiserumverdünnung in die Vertiefungen der Platten vorgegeben. Von den Antiseren wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe mit dem Medium hergestellt, beginnend mit der Verdünnung 1:4. Dazu werden in Plastik-Mikroröhrchen die entsprechenden Mengen Antiserum und Medium mit Hilfe eines Hamilton-Dispensers gemischt.

Die Testzellen werden auf eine Konzentration von 2×10^6 pro ml in RPMI 1640 Medium mit 10% inaktiviertem Kälberserum eingestellt. Jeweils 1 µl der Zellsuspension wird in die Vertiefungen mit dem Antiserum transferiert. Das Antiserum wird 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur mit den Testzellen inkubiert. Anschließend werden 5 µl Kaninchen-Komplement dazugegeben. Die Verdünnung des Kaninchen-Komplements richtet sich nach den Ergebnissen der Vortestung der Kaninchenseren. Dabei wird die Verdünnungsstufe des Kaninchenserums ermittelt, die optimale Titerstufen und gleichzeitig minimale Zytotoxizität gegenüber Kontrollzellen erbrachte. Zum Teil wurde das Kaninchenserum auch unverdünnt eingesetzt.

Die Inkubation der Testzellen mit dem Antiserum und dem Kaninchen-Komplement wird nach 60 Minuten beendet. Danach erfolgt die Färbung mit 5% Eosin-Lösung. Durch Zugabe von 5% Formalin wird schließlich die Reaktion fixiert.

Als Kontrollen werden die Testzellen mit Medium und mit Medium und Komplement zusätzlich im Test mitgeführt.

Die Testreaktionen werden im Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Bei der vorliegenden Untersuchung wurde folgender Bewertungsmaßstab angelegt:

1+	2+	3+	4+	
10-20	20-50	50-70	70-100	%lysierte Zellen

Modifikation des Mikrozytotoxizitätstestes für die Untersuchung von B-Lymphozyten:
B-Lymphozyten sind lytischen Agentien gegenüber resistenter als T-Lymphozyten (73). Dementsprechend werden die Inkubationszeiten für B-Lymphozyten verlängert.

Die Inkubation mit dem Antiserum beträgt hier 60 Minuten, die Inkubationszeit für das Komplement 120 Minuten.

7. Auswertung der Testergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mikrozytotoxizitätstest mit bereits HLA-typisierten PBL und LCL mit dem Ziel durchgeführt, die Spezifität der heterologen Antiseren zu ermitteln.

Die Spezifität der heterologen Antiseren wird hergeleitet aus dem Reaktionsmuster der Seren mit den Testzellen. Die Aussagen über die Spezifität der untersuchten Antiseren beruhen außerdem auf statistischen Berechnungen. Dazu wurden die Reaktionsmuster der Antiseren in 2 x 2 Kontingenztafeln analysiert.

Beispiel:

	Test +	Test -	
HLA-A 9 +	18^a	25^b	a + b
HLA-A 9 -	59^c	136^d	c + d
	a + c	b + d	N

[a] Anzahl der positiven Testreaktionen mit Testzellen, die das untersuchte HLA-Antigen tragen

[b] Anzahl der abweichend negativen Testreaktionen

[c] Anzahl der abweichend positiven Testreaktionen

[d] Anzahl der negativen Testreaktionen

[N] Anzahl aller durchgeführten Untersuchungen

Auskunft über einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen einer HLA-Eigenschaft und den Antikörpern im Antiserum gibt der X^2-Test.
Das X^2 wird berechnet nach der Formel:

$$X^2 = \frac{(ad - bc)^2 \, N}{(a+c)(b+d)(a+b)(c+d)}$$

im Beispiel:

$$X^2 = \frac{(2448-1475)^2 \, 238}{77 \times 161 \times 43 \times 195} = 2{,}1$$

Die Irrtumswahrscheinlichkeit p beträgt für $X^2 = 3,84$ $p = 0,05$, für $X^2 = 6,63$ $p = 0,01$ und für $X^2 = 10,83$ $p = 0,001$.

Wenn das Produkt aus den unerwartet negativen und positiven Reaktionen, b x c, größer ist als das der positiven und negativen Reaktionen, a x d, so besteht keine Beziehung zwischen den Antikörpern im Antiserum und dem untersuchten HLA-Antigen.

Den Grad der positiven oder negativen Assoziation zwischen dem untersuchten HLA-Antigen und dem Antiserum gibt auch der Korrelationskoeffizient r nach PEARSON an (74).

$$r = \sqrt{\frac{X^2}{N}}$$

in dem Beispiel: $r = 0,095$

Der Wertebereich von r reicht von +1 bis -1. Positive Korrelationen sind bei positiven r-Werten angezeigt; keine Assoziation besteht, wenn r negative Werte annimmt. Werte um 0 weisen ebenfalls auf eine fehlende Korrelation hin.

Wenn die beobachteten Werte a, b, c und d in der Kontingenztafel kleiner sind als fünf, kann der X^2-Test nicht angewendet werden. In diesen Fällen wird die Irrtumswahrscheinlichkeit p nach dem FISHER-Exakt-Test berechnet:

$$p = \frac{(a+b)!\,(c+d)!\,(a+c)!\,(b+d)!}{N!\,a!\,b!\,c!\,d!}$$

Die p_2-Werte des FISHER-Testes bei zweiseitiger Überprüfung der Häufigkeitsverteilung geben Anhaltspunkte dafür, inwieweit es sich bei den Häufigkeiten in der

Vierfeldertafel um rein zufällige oder um statistisch signifikante Verteilungen handelt.

Die Merkmalsalternativen - Testzellen, die positiv für ein HLA - Merkmal und im Test mit dem Antiserum positiv oder negativ waren bzw. Testzellen, die nicht das untersuchte Antigen hatten und im Test positive oder negative Resultate hatten - sind voneinander unabhängig, wenn sie proportional zu den Randsummen (a + b), (a + c), (c + d) und (b + c) verteilt sind. In diesem Fall liegen die p_2-Werte außerhalb der konventionellen Signifikanzschranken für die Irrtumswahrscheinlichkeit.

Bei bestehender Kontingenz ergeben sich Wahrscheinlichkeitswerte im Signifikanzbereich. Damit kann die Nullhypothese abgelehnt werden, die postuliert, daß rein zufällige Häufigkeitsverteilungen der Merkmalskombinationen vorliegen.

ERGEBNISTEIL

1. Versuchsplan

Die vorliegenden Untersuchungen an heterologen Anti-HLA-Antiseren sind in Vor- und Hauptversuche unterteilt.

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Experimente.

In den Vorversuchen wurde die grundsätzliche Möglichkeit geprüft, durch heterologe Immunisierung von Kaninchen mit LCL-Zellen Antiseren zu produzieren, die gegen definierte Gruppenspezifitäten gerichtet sind.

Zunächst wurden folgende grundlegende Fragen untersucht:
- Können Kaninchen bei der Immunisierung mit LCL-Zellen unterschiedliche Gruppenspezifitäten des Immunogens erkennen?
  Werden daraufhin Antikörper gebildet, die für die Gruppenspezifitäten des Immunogens charakteristisch sind?
- Können Antikörper mit Gruppenspezifität, die möglicherweise im serologischen Nachweis durch unspezifische Reaktionen verdeckt bleiben, nach gezielter Absorption der Antiseren mit LCL-Zellen noch identifiziert werden?

Zur Klärung dieser Fragen wurden Kaninchen mit vier HLA-differenten LCL-Zellen (Tabelle 3) immunisiert. Nach Ablauf der Immunisierung wurden die Kaninchenseren im Mikrozytotoxizitätstest auf die Spezifität der enthaltenen Antikörper hin untersucht.

Die Antiseren reagierten zunächst mit den Testzellen, ohne Unterschiede bezüglich der HLA-Eigenschaften erkennen zu lassen.

Tabelle 3 Übersicht über die Experimente mit heterologen Anti-HLA-Antiseren

	Immunogen	Absorbiert mit LCL	Anzahl der Untersuchungen im Mikrozytotoxizitätstest			
	HLA-Phänotyp	HLA-Phänotyp	Serumverdünnung 1 : 4 - 1 : 64			
Vorversuche						
Antiserum 1	IFH - 17 2-15/2-15	IFH - 10 2-12/2-12	PBL 35 LCL 20			
Antiserum 2	IFH - 17 2-15/2-15	IFH - 16 29-12/2-12	PBL 34 LCL 21			
Antiserum 3	IFH - 10 2-12/2-12	IFH - 17 2-15/2-15	PBL 29 LCL 19			
Antiserum 4	IFH - 16 29-12/2-12	IFH - 10 2-12/2-12	PBL 11 LCL 5			
Antiserum 5	IFH - 14 3-W 35/2-15	IFH - 18 3-W 35/2-15	PBL 16 LCL 8			
Hauptversuche			1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64
Antiserum 6	IFH - 10 2-12/2-12	IFH - 18 3-W 35/2-15	PBL 290 LCL 22	115 22	114 22	115 22
Antiserum 7	IFH - 16 29-12/2-12	IFH - 18 3-W 35/2-15	PBL 217 LCL 21	123 21	124 21	123 21
			Anzahl der Untersuchungen auf B-Zell-Spezifität			
Antiserum 6			PBL 81			
Antiserum 7			PBL 107			

Daraufhin wurde versucht, durch Absorption der Antiseren mit verschiedenen LCL-Zellen (Tabelle 3) das Reaktionsspektrum der Antiseren zu reduzieren.

Als Zellinien zur Absorption wurden LCL gewählt, die bezüglich des HLA-Phänotyps mit dem des Immunogens in einer Eigenschaft übereinstimmten (Antiserum 1 - 3) bzw. nahezu HLA-identisch waren (Antiserum 4 und 5).

Im ersten Fall wurde versucht, durch die Absorption das Antikörpergemisch auf Antikörper mit der Spezifität für HLA-B 15 (Antiserum 1 und 2) bzw. HLA-B 12 (Antiserum 3) einzugrenzen.

Im zweiten Fall (Antiserum 4 und 5) wurde geprüft, ob durch die Absorption alle Antikörper mit HLA-Spezifität eliminiert werden.

Voraussetzung für die Testung der Antiseren mit LCL und PBL im Mikrozytotoxizitätstest war die vollständige Absorption der Antiseren. D.h. die Antiseren sollten im Test mit den LCL, die zur Absorption eingesetzt waren, keine positiven Reaktionen mehr aufweisen.

In den Hauptversuchen mit den Antiseren 6 und 7 wurde das Beispiel des Antiserum 3 nochmal aufgegriffen und weiter ausgebaut.

Die Untersuchungen auf HLA-A- oder HLA-B-Spezifität der Antiseren wurden auf mehr Testzellen ausgedehnt.

Weiterhin wurde geprüft, ob in den Seren auch Antikörper mit Aktivität gegenüber B-Zell-Eigenschaften vorhanden sind.

Die Analyse zur Charakterisierung der Antiseren erfolgt in drei Schritten:

1. Darstellung der positiven Reaktionen des Antiserums im Mikrozytotoxititätstest. Beurteilung der positiven Testergebnisse. Hypothese für die Spezifität der Antiseren.
2. Überprüfen der Hypothese: Statistische Auswertung der positiven und negativen Testergebnisse.
3. Diskussion über die Spezifität der Antiseren unter Berücksichtigung möglicher Kreuzreaktionen.

2. Vorversuche

2.1. Antiserum 1

In Tabelle 4 sind die Untersuchungen des Antiserums 1 mit PBL und LCL im Mikrozytotoxizitätstest zusammengefaßt.

Tabelle 4

Ergebnisse der Untersuchungen des Antiserums 1

	Antiserumverdünnungen				
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Anzahl der Untersuchungen mit PBL	35	35	35	35	35
2-4fach positiv	15	13	7	6	2
negativ	20	22	28	29	33
Anzahl der Untersuchungen mit LCL	20	20	20	20	20
2-4fach positiv	12	8	5	1	-
negativ	8	12	15	19	20

Die positiven Testergebnisse sind in Tabelle 5 detailliert dargestellt.

Tabelle 5

Positive Reaktionen der Testzellen mit dem Antiserum 1 im Mikrozytotoxizitätstest

Testzellen	HLA-Phänotyp	Antiserum-Verdünnungen 1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
LCL-IFH-17	2-15/2-15	4	4	4	2	-	
-14	3-W 35/2-15	4	4	3	-	-	
- 7	3-18/3-18	4	4	-	-	-	
PBL-12	9-12/15	4	4	4	4	2	
-17	2-9/15-W 16	4	4	4	4	2	Gruppe 1
-20	11-W 35/2-15	4	4	4	2	-	
-13	2-3/7-15	4	4	3	2	-	
-14	1 11 W 35	4	4	3	2	-	
LCL-IFH- 6	1-8/1-8	4	3	2	-	-	
-20	3-W 35/3-W 35	4	2	-	-	-	
- 1	2 8 W 35	3	3	2	-	-	
-18	3-W 35/2-15	3	3	2	-	-	
-13	2-40/2-40	3	3	-	-	-	
PBL-30	3 7 W 22	4	3	-	-	-	
-26	1 9 8 W 35	4	2	-	-	-	
-27	2 W 35 40	4	2	-	-	-	Gruppe 2
- 7	2 27 15	3	3	3	2	-	
- 6	3-W 35/25-W16	3	3	-	-	-	
-37	2 3 7 W 22	3	2	-	-	-	
LCL-IFH-25	11-W 35/2-18	2	-	-	-	-	
-27	9-W 35/11-W 35	2	-	-	-	-	
-28	9-W 35/11-W 35	2	-	-	-	-	
- 2	3-7/3-7	2	-	-	-	-	
PBL-34	1-8/2-40	2	2	2	-	-	
-31	2-8/2-40	2	2	-	-	-	Gruppe 3
-38	2 3 7 15	2	-	-	-	-	
-22	29 W 32 27 W35	2	-	-	-	-	

Aus der Tabelle 5 geht hervor, daß Testzellen mit der Eigenschaft HLA-B 15 mit dem Antiserum 1 am stärksten reagierten. Ausnahmen machen LCL-IFH-18 und PBL-7 und -38.

Die zweite Gruppe positiver Testzellen (bei den Antiserumverdünnungen 1:4 und 1:8 bis zu 70% positiv) besteht aus LCL und PBL, die vorwiegend die Eigenschaften HLA-A 2, -B 40 und -B W 35 aufweisen.

Auch in der dritten Gruppe mit positiven Testzellen (bei der Antiserum-Verdünnung 1:4 bis zu 50% lysierte Zellen) überwiegen Lymphozyten mit den HLA-Markern B W 35 und B 40.

Daraus kann gefolgert werden, daß das Antiserum 1 Antikörper der Spezifität für HLA-B 15, -B W 35 oder -B 40 enthält.

Um die Spezifität des Antiserums 1 beurteilen zu können, werden die positiven Reaktionen den negativen gegenübergestellt. Dazu sind in Tabelle 6 die HLA-Eigenschaften der Testzellen und die entsprechenden Häufigkeiten der Kontingenztafeln einzeln aufgeführt.
Der Vergleich der positiven und negativen Testergebnisse bestätigt die Annahme, daß im Antiserum 1 Antikörper gegen die HLA-Eigenschaften B 15, B W 35 und eventuell auch B 40 vorhanden sind. Die Reaktionen mit diesen Antigenen verliefen in den meisten Fällen positiv. Die Gegenprobe auf falsch negative Ergebnisse (HLA +, Test -) ergab keine (HLA-B 15) bzw. eine (B W 35) und zwei (B 40) Ausnahmen. Relativ hoch hingegen sind die Angaben für die falsch positiven Werte (HLA-, Test +).

Tabelle 6

HLA-Antigene der Testzellen und ihre Korrelation mit dem Antiserum 1 in der Verdünnung 1:4

HLA-	Phänotypfrequenz %	a	b	c	d	x^2	r
B W 35	25,4	13	1	14	27	14,39	0,51
A 3	32,7	10	8	17	20	0,44	0,09
A 2	54,5	15	15	12	13	0,02	0,01
B 8	23,6	5	8	22	20	0,76	-0,11
A 1	21,8	4	8	23	20	1,52	-0,16
B 7	29,1	5	11	22	17	2,87	-0,22
B 12	21,8	1	11	26	17	10,20	-0,43
		a	b	c	d	p_2	
B 15	16,4	9	0	18	28	1,47	E-3
A 11	10,9	5	1	22	27	0,16	
B 40	10,9	4	2	23	26	0,62	
A 9	18,2	4	6	23	22	0,76	
B 27	3,6	2	0	25	28	0,46	
B 18	3,6	2	0	25	28	0,46	
A 25	7,3	1	3	26	25	0,62	
B W 16	9,1	2	3	25	25	1	
B W 22	5,4	2	1	25	27	0,96	
A W 32	1,8	1	0	26	28	0,98	
A 29	3,6	1	1	26	27	1	

Von Interesse ist die Frage: Sind nach der Absorption des Antiserums 1 mit der LCL-IFH-10 noch Antikörper mit der Spezifität für HLA-A 2 -Antigene vorhanden? Das Reaktionsmuster für das Antigen HLA-A 2 und auch für das Antigen HLA-A 3 (Tabelle 5) könnte die Vermutung nahelegen, daß sich im Antiserum 1 noch Antikörper gegen HLA-A 2 und HLA-A 3 befinden.

Dem ist entgegenzuhalten, daß in den positiven Fällen von HLA-A 2 (14 Testzellen) bzw. HLA-A 3 (6 Testzellen) auch die Eigenschaften HLA-B 15, -B W 35 oder -B 40 auf den Testzellen ausgeprägt waren.

Das gilt auch für die Eigenschaften HLA-A 11 (5 Testzellen),- B 27 (2 Testzellen) und - B W 16 (2 Testzellen).

Die Untersuchungen mit dem Antiserum 1 waren als Vorversuch konzipiert und umfaßten daher relativ wenige Testzellen. Dennoch geht daraus hervor, daß bei der heterologen Immunisierung mit LCL-Zellen HLA-spezifische Antikörper entstanden sind. Durch Absorption des Antiserums mit LCL-Zellen konnte die Aktivität der spezifischen Antikörper im serologischen Nachweis hervorgehoben werden.

2.2. Antiserum 2

Antiserum 2 unterscheidet sich vom Antiserum 1 nur bezüglich der zur Absorption eingesetzten LCL. Während Antiserum 1 mit LCL-IFH-10 absorbiert wurde, wurde das Antiserum 2 mit LCL-IFH-16 absorbiert.

Beide Zellinien sind für die Eigenschaft HLA - B 12 homozygot.
IFH-10 ist weiterhin für die Eigenschaft HLA-A 2 homozygot, nicht jedoch die LCL-IFH-16, die zusätzlich die Eigenschaft HLA-A 29 aufweist.

Die Untersuchungen am Antiserum 2 stellen eine Ergänzung zu den Testen mit Antiserum 1 dar. Die Gegenüberstellung der Untersuchungsergebnisse beider Antiseren gibt Auskunft darüber, inwieweit durch Absorption der Antiseren mit HLA-ähnlichen LCL vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können.

In Tabelle 7 sind alle Untersuchungen des Antiserums 2 im Mikrozytotoxizitätstest mit PBL und LCL aufgeführt.

Tabelle 7

Ergebnisse der Untersuchungen mit Antiserum 2

	Antiserumverdünnungen				
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Anzahl der Untersuchungen mit PBL	34	34	34	34	34
2-4fach positiv	11	7	2	1	1
negativ	23	27	32	33	33
Anzahl der Untersuchungen mit LCL	21	21	21	21	21
2-4fach positiv	6	5	2	-	-
negativ	15	16	19	21	21

Tabelle 8 beinhaltet die Aufstellung aller positiven Testergebnisse im Mikrozytotoxizitätstest mit Antiserum 2 und PBL bzw. LCL.

Tabelle 8

Positive Reaktionen der Testzellen mit dem Antiserum 2 im Mikrozytotoxizitätstest.

Testzellen	HLA-Phänotyp	Antiserum-Verdünnungen 1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
LCL-IFH-18	3-W 35/2-15	4	3	2	-	-	
-17	2-15/2-15	4	3	-	-	-	
-14	3-W 35/2-15	4	3	-	-	-	
PBL-17	2-9/15-W 16	4	4	4	3	2	Gruppe 1
-20	11-W 35/2-15	4	4	3	-	-	
-28	1 9 15 W 21	4	2	-	-	-	
LCL-IFH-20	3-W 35/3-W 35	3	3	3	-	-	
- 6	1-8/1-8	3	3	-	-	-	
-13	2-40/2-40	3	-	-	-	-	
PBL- 7	2 27 15	3	2	-	-	-	
-13	2-3/7-15	3	2	-	-	-	Gruppe 2
-14	1 11 W 35	3	2	-	-	-	
-22	29 W 32 27 W 35	3	2	-	-	-	
-16	25 40 W 22	3	-	-	-	-	
PBL-26	1 9 8 W 35	2	-	-	-	-	
-27	2 W 35 40	2	-	-	-	-	Gruppe 3
-38	2 3 7 15	2	-	-	-	-	

Von insgesamt 55 Testzellen reagierten 17 im Mikrozytotoxizitätstest mit dem Antiserum 2 in der Verdünnung 1:4. Die Unterteilung der positiven Testfälle nach der Stärke der Reaktionen ergibt auch beim Antiserum 2 drei Gruppen.

Testzellen mit dem Antigen HLA-B 15 bilden die Gruppe 1 und kommen auch in der Gruppe 2 vor. PBL-38 mit dem Antigen HLA-B 15 hatte im Test nur ein schwach positives Resultat. Testzellen mit den HLA-Eigenschaften B W 35 und B 40 sind auch bei der Untersuchung mit dem Antiserum 2 in den Gruppen 2 und 3 mit den schwach positiven Ergebnissen. Das bedeutet, daß auch beim Antiserum 2 kreuzreagierende Antikörper gegen die Alloantigene HLA-B W 35 und -B 40 nachweisbar sind.

Um die Spezifität der Anti-HLA-Antikörper im Antiserum 2 bestimmen zu können, werden auch die negativen Testergebnisse in Betracht gezogen (Tabelle 9).

Der Überblick über positive, "falsch positive", negative und "falsch negative" Antikörper-Antigen-Interaktionen des Antiserum 2 im Mikrozytotoxizitätstest veranschaulicht, daß die Aktivität der Anti-HLA-B 15 Antikörper im Antiserum 2 dominiert. Alle Testzellen mit der Eigenschaft HLA-B 15 wurden lysiert.

Zu den restlichen 8 Testzellen mit positiven Reaktionen gehören Lymphozyten mit den Antigenen HLA-B W 35 und -B 40 und LCL-IFH-6 mit dem HLA-Phänotyp 1-8/1-8.

Tabelle 9

HLA-Antigene der Testzellen und ihre Korrelation mit dem Antiserum 2 in der Verdünnung 1:4

HLA -	Phänotypfrequenz %	a	b	c	d	X^2	r
A 2	52,7	10	19	7	19	0,36	0,081
A 3	32,7	5	13	12	25	0,12	-0,047
B 7	30,1	2	15	15	23	4,22	-0,277
		a	b	c	d	p_2	
B 15	16,4	9	0	8	38	7,6	E-6
B W 35	25,4	8	6	9	32	0,03	
B 27	3,6	2	0	15	38	0,18	
B 8	20,0	2	9	15	29	0,52	
A 1	21,8	4	8	13	30	1	
B 40	14,5	3	5	14	33	1	
A 9	16,4	3	6	14	32	1	
A W 32	1,8	1	0	16	38	0,60	
A 11	10,9	2	4	15	34	1	
B W 16	9,0	1	4	16	34	1	
A 25	9,0	1	4	16	34	1	
B W 22	7,3	1	3	16	35	1	
A 29	3,6	1	1	16	37	1	
B W 21	3,6	1	1	16	37	1	

Vergleicht man die Reaktionen der Antiseren 1 und 2 mit den Antigenen HLA-B 15, -B W 35 und -B 40, so kann folgende Feststellung gemacht werden:
Die Ergebnisse der beiden Antiseren mit dem Antigen HLA-B 15 stimmen bei den Verdünnungsstufen 1:4 und 1:8 nahezu überein (Tabelle 10).

Die Reaktionen mit den Antigenen HLA-B W 35 und -B 40 hingegen fallen bei beiden Antiseren unterschiedlich aus.

Das Antiserum 1 lysierte in der Verdünnung 1:4 90% der HLA-B W 35 - positiven Testzellen und 60% der HLA-B 40-positiven Testzellen.
Mit dem Antiserum 2 reagierte vergleichsweise die Hälfte dieser Testzellen.
Die Kreuzreaktionen der Antiseren 1 und 2 mit dem Antigen HLA-B W 35 konnten in der Verdünnung 1:8 um die Hälfte reduziert werden.
Im Unterschied zum Antiserum 1 waren beim Antiserum 2 in der Verdünnung 1:8 keine Reaktionen mit HLA-B 40 - positiven Testzellen mehr nachweisbar.

Tabelle 10

Vergleich zwischen den Reaktionen der Antiseren 1 und 2 mit HLA-B 15, -B W 35 oder -B 40 - positiven Testzellen.

1. Antiserum-Verdünnung 1:4

Testzellen	Antiserum 1 HLA+	Test+	Antiserum 2 HLA+	Test+
HLA-B 15-positiv getestet 9	9 (100%)	6 x 4+ 2 x 3+ 1 x 2+	9 (100%)	6 x 4+ 2 x 3+ 1 x 2+
HLA-B W 35-positiv getestet 11	10 (90%)	4 x 4+ 2 x 3+ 4 x 2+	5 (45%)	3 x 3+ 2 x 2+
HLA-B 40-positiv getestet 5	3 (60%)	1 x 3+ 2 x 2+	2/7 (28%)	← 2 x 3+

2. Antiserum-Verdünnung 1:8

HLA-B 15-positiv getestet 9	8 (89%)	6 x 4+ 2 x 3+	8 (89%)	2 x 4+ 3 x 3+ 3 x 2+
HLA-B W 35-positiv getestet 11	6 (54%)	3 x 3+ 3 x 2+	3 (27%)	1 x 3+ 2 x 2+
HLA-B 40-positiv getestet 5	3 (60%)	1 x 3+ 2 x 2+		-

2.3. Antiserum 3

Als Immunogen für das Antiserum 3 wurde LCL-IFH-10 verwendet. Die Absorption des Antiserums erfolgte mit LCL-IFH-17. Damit wurde in umgekehrter Weise wie beim Antiserum 1 verfahren, das LCL-IFH-17 als Immunogen und LCL-IFH-10 als Zellinie zur Absorption hatte.

Dieser Versuch diente wiederum der Frage, ob bei der heterologen Immunisierung mit LCL-Zellen HLA-spezifische Antikörper gebildet werden. Weiterhin stehen mögliche Kreuzreaktionen des absorbierten Antiserums im Mittelpunkt der Diskussion.

Tabelle 11 dokumentiert die Anzahl der Untersuchungen mit Antiserum 3 im Mikrozytotoxizitätstest.

Tabelle 11

Untersuchungen des Antiserums 3 im Mikrozytotoxizitätstest

	Antiserumverdünnungen				
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Anzahl der Untersuchungen mit PBL	29	29	29	29	29
2-4fach positiv	10	10	8	6	4
negativ	19	19	21	23	25
Anzahl der Untersuchungen mit LCL	19	19	19	19	19
2-4fach positiv	9	8	7	7	3
negativ	10	11	12	12	16

Die positiven Testergebnisse werden in Tabelle 12 ausführlich dargestellt.

Tabelle 12 Positive Testreaktionen mit dem Antiserum 3

Testzellen	HLA-Phänotyp	Antiserum-Verdünnungen 1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
LCL-IFH-22	25-12/1-8	4	4	4	4	4	
- 5	2-12/2-12	4	4	4	3	-	
PBL-29	2-12/9-13	4	4	4	4	4	
- 1	2 W 19 12 13	4	4	4	4	4	Gruppe 1
-35	2-12/28-14	4	4	4	4	2	
-33	1-8/2-13	4	4	4	3	-	
-28	1 9 15 W 21	4	4	4	2	-	
LCL-IFH-10	2-12/2-12	3	3	3	3	3	
-16	29-12/2-12	3	3	3	3	3	
-23	25-12/1-8	3	3	3	3	-	
-21	2-17/2-17	3	3	3	2	-	Gruppe 2
PBL-19	3 5 2	3	3	3	3	3	
-36	9 26 7 W 16	3	3	3	-	-	
- 6	3-W 35/25-W 16	3	3	3	-	-	
LCL-IFH-19	3-7/10-18	2	2	2	2	-	
-27	9-W 35/11-W 35	2	2	-	-	-	
-28	9-W 35/11-W 35	2	-	-	-	-	Gruppe 3
PBL- 7	2 27 15	2	2	-	-	-	
-11	9 10 7 12	2	2	-	-	-	

Die Verteilung der positiven Testzellen mit dem Antigen HLA-B 12 in den Gruppen 1 und 2 mit 4 bzw. 3fach positiven Resultaten im Mikrozytotoxizitätstest gibt bereits einen Hinweis auf die Spezifität des Antiserums 3.
9 von 19 positiven Testzellen (Antiserumverdünnung 1:4) haben die Eigenschaft HLA-B 12.

In Tabelle 13 ist die statistische Analyse der Untersuchungsergebnisse von Antiserum 3 in der Verdünnung 1:4 zusammengefaßt.

Tabelle 13

HLA-Antigene der Testzellen und ihre Korrelation mit dem Antiserum 3 in der Verdünnung 1:4

HLA-	Phänotypfrequenz %	a	b	c	d	X^2	r
A 2	47,9	10	13	9	16	0,28	0,07
B W 35	27,1	3	10	16	19	2,03	-0,20
B 7	29,1	3	11	16	18	2,72	-0,23
A 3	31,2	3	12	16	17	3,49	-0,26
		a	b	c	d	p_2	
B 12	20,8	9	1	10	28	8,4	E-4
A 9	14,6	6	1	13	28	0,02	
B 13	6,2	3	0	16	29	0,10	
B W 16	4,2	2	0	17	29	0,30	
B 8	22,9	3	8	16	21	0,54	
A 1	20,8	4	6	15	23	1	
A 10	6,2	2	1	17	28	0,68	
A 11	10,4	2	3	17	26	1	
B 15	10,4	2	3	17	26	1	
A 26	2,1	1	0	18	29	0,78	
B 17	2,1	1	0	18	29	0,78	
B W 21	2,1	1	0	18	29	0,78	
B 5	6,2	1	2	18	27	1	
B 18	4,2	1	1	18	28	1	
B 27	4,2	1	1	18	28	1	

Von den "falsch positiven" Testzellen waren vier HLA-A 2-positiv (LCL-IFH-21, PBL-33, -19 und -7), vier Testzellen haben das Antigen HLA-A 9 gemeinsam (LCL-IFH-27 und -28, PBL-28 und -36) und die restlichen zwei Testzellen (LCL-IFH-19 und PBL-6) stimmen in dem Marker HLA-A 3 überein.

Aus den Vergleichswerten der positiven und negativen Testergebnisse dieser HLA-Antigene ist zu errechnen, daß 17% der getesteten HLA-A 2-,57% der HLA-A 9-positiven und 20% der HLA-A 3-positiven Lymphozyten mit dem Antiserum 3 in der Verdünnung 1:4 reagierten.

Bei diesen Angaben sind die Testzellen nicht einbezogen, die zusätzlich das Antigen HLA-B 12 aufwiesen.

Das Antiserum 3 kann auf Grund der Untersuchungen als für HLA-B 12 spezifisch charakterisiert werden.
Die Reaktionen mit Testzellen der Eigenschaft HLA-A 2 sind möglicherweise auf eine nicht vollständige Absorption zurückzuführen.

Tabelle 14 gibt eine Zusammenfassung aller Untersuchungen, die mit den Antiseren 1-3 im Mikrozytotoxizitätstest durchgeführt wurden.

Tabelle 14

Übersicht über Testergebnisse mit den Antiseren 1-3

Antiseren	Antiserum 1	Antiserum 2	Antiserum 3
Immunogen	IFH-17	IFH-17	IFH-10
HLA-Phänotyp	2-15/2-15	2-15/2-15	2-12/2-12
Absorption mit LCL	IFH-10	IFH-16	IFH-17
HLA-Phänotyp	2-12/2-12	29-12/2-12	2-15/2-15
	Verdünnung	Verdünnung	Verdünnung
Testzellen	1:4	1:4	1:4
1. LCL- IFH-	HLA-Phänotyp		
1	2 8 W 35	+	-	-
2	3-7/3-7	+	-	-
3	2 3 7 40	.	-	.
5	2-12/2-12	-	-	+
6	1-8/1-8	+	+	-
7	3-18/3-18	+	-	-
8	10-W 16/3-W 21	-	-	.
10	2-12/2-12	-	-	+
13	2-40/2-40	+	+	-
14	3-W 35/2-15	+	+	-
16	29-12/2-12	-	-	+
17	2-15/2-15	+	+	-
18	3-W 35/2-15	+	+	-
19	3-7/10-18	-	-	+
20	3-W 35/3-W 35	+	+	-
21	2-17/2-17	-	-	+
22	25-12/1-8	-	-	+
23	25-12/1-8	-	-	+
25	11-W 35/2-18	+	-	-
27	9-W 35/11-W 35	+	-	+
28	9-W 35/11-W 35	+	-	+

Bewertung: 2-4fach positiv = +
1fach positiv und negativ = -
nicht getestet = .

Fortsetzung Tabelle 14

Antiseren	Antiserum 1	Antiserum 2	Antiserum 3
Immunogen	IFH-17	IFH-17	IFH-10
HLA-Phänotyp	2-15/2-15	2-15/2-15	2-12/2-12
Absorption mit LCL	IFH-10	IFH-16	IFH-17
HLA-Phänotyp	2-12/2-12	29-12/2-12	2-15/2-15
	Verdünnung	Verdünnung	Verdünnung
Testzellen	1:4	1:4	1:4

2. PBL-	HLA-Phänotyp			
1	2 W 19 12 13	-	-	+
2	3-7/9-7	-	-	-
3	2 3 12 W 16	-	.	.
4	1-8/W 19-5	-	-	-
5	2 9 12 17	-	.	.
6	3-W 35/25-W 16	+	-	+
7	2 27 15	+	+	+
8	1-8/2-7	-	.	.
9	3 11 7 W 35	-	-	-
10	28 7 14	-	-	-
11	9 10 7 12	-	-	+
12	9-12/15	+	.	.
13	2-3/7-15	+	+	-
14	1-11/W 35	+	+	-
15	26 12 W 16	.	-	.
16	25 40 W 22	.	+	.
17	2-9/15-W 16	+	+	.
18	2-7/28-14	-	-	-
19	3-5/2	-	-	+
20	11-W 35/2-15	+	+	.
21	1 10 8 W 22	-	-	-
22	29 W 32 27 W 35	+	+	-
23	3-7/2-5	-	-	-
24	2-7/1	.	-	-
25	2-3/7-40	-	-	-
26	1 9 8 W 35	+	+	-
27	2 W 35 40	+	+	-
28	1 9 15 W 21	.	+	+
29	2-12/9-13	-	-	+
30	3 7 W 22	+	-	-
31	2-8/2-40	+	-	-
32	1 7 8	-	-	-
33	1-8/2-13	-	-	+
34	1-8/2-40	+	-	-
35	2-12/28-14	-	-	+
36	9 26 7 W 16	-	-	+
37	2 3 7 W 22	+	-	-
38	2 3 7 15	+	+	.
39	1-8/2-5	-	.	.

2.4. Antiserum 4 und 5

Am Beispiel der Antiseren 4 und 5 wird gezeigt, daß durch Absorption mit LCL-Zellen, die HLA-A- und -B-identisch mit dem Immunogen sind, alle HLA-spezifischen Antikörper aus dem Serum entfernt werden.

Im Fall des Antiserums 4 (Anti-IFH-16) wurde mit LCL-IFH-10 absorbiert. Diese Zellinie wurde von PBL eines Blutspenders angelegt, der zum Blutspender von IFH-16 nicht verwandt ist.

Antiserum 5 (Anti-IFH-14) wurde mit LCL-IFH-18 absorbiert. Diese Zellinie wurde von einer Schwester des Blutspenders von IFH-14 etabliert.

Nach der Absorption der beiden Antiseren konnte im Mikrozytotoxizitätstest keine Reaktion der Antiseren mit den Testzellen mehr nachgewiesen werden (Tabelle 15).

Offensichtlich konnten durch die Absorption alle HLA-spezifischen Antikörper entfernt werden.

Tabelle 15

Untersuchungen mit Antiserum 4 und 5 im Mikrozytotoxizitätstest

Antiseren	Antiserum 5	Antiserum 4
Immunogen	LCL-IFH-14	LCL-IFH-16
HLA-Phänotyp	3-W 35/2-15	29-12/2-12
Absorption mit LCL	IFH-18	IFH-10
HLA-Phänotyp	3-W 35/2-15	2-12/2-12
	Verdünnung	Verdünnung
Testzellen	1:4 - 1:64	1:4 - 1:64
1. LCL-IFH- HLA-Phänotyp		
5 2-12/2-12	-	-
10 2-12/2-12	-	-
14 3-W 35/2-15	-	-
16 29-12/2-12	-	-
17 2-15/2-15	-	.
18 3-W 35/2-15	-	.
19 3-7/10-18	-	.
28 9-W 35/11-W 35	-	.
2. PBL-		
1 2 W 19 12 13	.	-
4 1-8/W 19-5	-	.
7 2 27 15	.	-
8 1-8/2-7	-	.
10 28 7 14	.	-
12 9-12/15	-	.
13 2-3/7-15	-	.
14 1-11/W 35	-	.
15 26 12 W 16	.	-
17 2-9/15-W 16	-	.
23 3-7/2-5	-	.
25 2-3/7-40	-	.
27 2 W 35 40	-	.
29 2-12/9-13	-	.
30 3 7 W 22	-	-
31 2-8/2-40	-	.
32 1 7 8	.	-
34 1-8/2-40	-	-
35 2-12/28-14	-	.
39 1-8/2-5	-	.
40 2-27/3-W 35	.	-
41 3-7/2-8	.	-
42 3-7/10-12	.	-
43 3 13 18	.	-

Fortsetzung Tabelle 15

44	3-W 35/2-15	-	.
45	1-8/2-12	-	.
46	1-10/7-8	-	.
47	1-17/W 33-14	-	.
48	1-17/W 22	-	.
49	3-5/7	-	.
50	2-W 35/W 19-W 16	-	.
51	2-W 35/2-W 35	-	.
52	9-7/W 19-W 16	-	.
53	3-7/3-7	-	.
54	2-40/2-15	-	.
55	3-7/2-40	-	.
56	3-7/2-15	-	.

3. Heterologe Anti-HLA-B 12-Antiseren

Bei der Besprechung der Vorversuche wurde bereits auf die Antiseren 6 und 7 eingegangen.

Das Antiserum 6 entspricht dem Antiserum 3 (Anti-LCL-IFH-10), das nunmehr mit LCL-IFH-18 absorbiert worden war.

Antiserum 4 und 7 entstanden durch Immunisierung mit LCL-IFH-16, unterscheiden sich daher nur bezüglich der LCL zur Absorption. Das Antiserum 7 wurde auch mit LCL-IFH-18 absorbiert.

Damit konnten zwei bezüglich des Immunogens verschiedene, heterologe Antiseren auf ihre Spezifität für das Antigen HLA-B 12 untersucht werden.

Weiterhin wurden die Antiseren 6 und 7 auf eine mögliche Spezifität gegen B-Zell-Eigenschaften überprüft.
Eine Übersicht über alle Reaktionen der Antiseren 6 und 7 im Mikrozytotoxizitätstest mit PBL und LCL als Testzellen gibt die Tabelle 16 (Anhang).

3.1. Antiserum 6

Bei der Auswahl der LCL zur Absorption werden im allgemeinen folgende Voraussetzungen berücksichtigt:

- Da für die Absorption größere Mengen an LCL-Zellen benötigt werden, eignen sich nur Zellkulturen, die ein kontinuierliches, gutes Wachstum aufweisen.
- Zur Absorption der Antiseren wurden nur LCL verwendet, die bezüglich ihres HLA-Phänotyps nicht vollständig mit den HLA-Eigenschaften des Immunogens übereinstimmten.

Bei der Absorption werden kreuzreagierende Anti-HLA-Antikörper im Antiserum von den entsprechenden HLA-Antigenen auf der Zelloberfläche der LCL-Zellen gebunden und können als Komplexe durch Zentrifugation aus dem Antiserum entfernt werden.
Das Antiserum 6 wurde mit der LCL-IFH-18 absorbiert.

3.1.1. Analyse der Spezifität für HLA-A- und HLA-B-Eigenschaften

Aus der Tabelle 17 kann die Anzahl der bei der Untersuchung des Antiserums 6 verwendeten Testzellen entnommen werden.

Tabelle 17

Anzahl der positiven und negativen Reaktionen des Antiserums 6

	getestet	2-4fach +	negativ	Antiserum-Verdünnung
LCL	22	9	13	1: 8
PBL	290	86	204	1: 8
LCL	22	9	13	1:16
PBL	115	42	73	1:16
LCL	22	6	16	1:32
PBL	114	19	95	1:32
LCL	22	3	19	1:64
PBL	115	13	102	1:64

In Abbildung 1 sind die prozentualen Anteile der positiven und negativen Resultate am Reaktionsmuster des Antiserums 6 graphisch dargestellt.

Alle positiven Testergebnisse mit dem Antiserum 6 sind in Tabelle 18 aufgelistet.

Abbildung 1 Reaktionen aller Testzellen im Mikrozytotoxizitätstest mit dem Antiserum 6

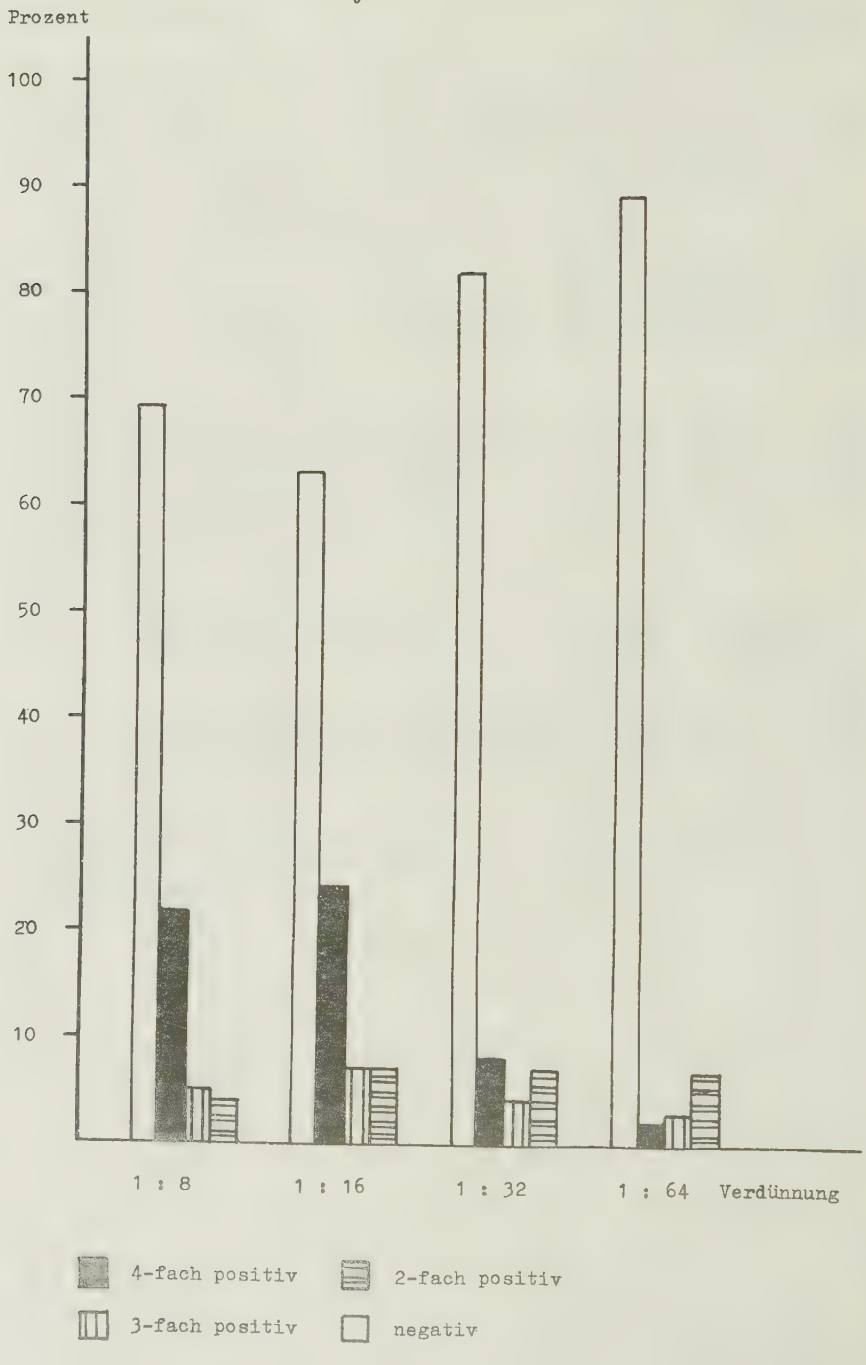


Tabelle 18

Positive Reaktionen der Testzellen im Mikrozytotoxizitätstest mit dem Antiserum 6

1. LCL als Testzellen
2. PBL als Testzellen, untersucht bei den Antiserum-Verdünnungen 1:8 - 1:64
3. PBL als Testzellen, die mit dem Antiserum 6 nur in der Verdünnung 1:8 getestet worden waren.

1. LCL als Testzellen

LCL-IFH-	HLA-Phänotyp	Antiserum - Verdünnungen 1:8	1:16	1:32	1:64
10	2-12/2-12	4	4	4	2
16	29-12/2-12	4	4	4	2
5	2-12/2-12	4	4	3	-
22	25-12/1-8	4	4	3	-
23	25-12/1-8	4	4	3	-
19	3-7/10-18	4	4	2	-
13	2-40/2-40	4	3	-	-
8	10-W 16/3-W 21	4	3	-	-
20	3-W 35/3-W 35	2	2	-	-

2. PBL als Testzellen

PBL Nr.	HLA-Phänotyp	Antiserum - Verdünnungen 1:8	1:16	1:32	1:64
13483	1 W 32 8 12	4	4	4	4
13486	9 29 W 21 12	4	4	4	4
13482	1 W 32 8 12	4	4	4	3
13478	1 9 8 12	4	4	4	3
29	2 9 13 12	4	4	4	2
13471	3 9 8 12	4	4	4	2
13453	2 26 5 12	4	4	4	2
35	2 28 14 12	4	4	4	2
1	2 W 19 13 12	4	4	4	2
13514	9 10 18 12	4	4	2	3
13487	9 5 12	4	4	.	3
13499	2 W 30 W 35 12	4	4	3	2
13479	1 9 8 12	4	4	2	2

PBL Nr.	HLA-Phänotyp				Antiserum-Verdünnungen 1:8	1:16	1:32	1:64
13485	1 W 32	8	12		4	4	3	-
13561	1	27	12		4	4	2	-
13496	2	40	12		4	3	2	-
13448	1 2	8	12		4	.	2	-
36	9 26	7	W 16		4	4	2	-
28	1 9	15	W 21		4	2	2	-
22	29 W 32	W 35	27		3	2	2	-
13562	1	27	12		4	4	-	-
13556	1 W 32	8	12		4	4	-	-
13524	1 28	8	12		4	4	-	-
13480	1 W 32		12		4	4	-	-
13476	9	W 16	12		4	4	-	-
13470	2 9	15	12		4	4	-	-
13460	2 3	40	12		4	4	-	-
13445	2 28	13	12		4	4	-	-
13444	1 29	8	12		4	4	-	-
13541	28 W 30	27	13		4	4	-	-
13539	28 9	27	13		4	4	-	-
13488	9 29	7	12		4	3	-	-
13452	2 26	5	12		4	3	-	-
13451	2	5	12		4	3	-	-
13553	3 W 32	37	12		4	2	-	-
13559	1	27	12		4	2	-	-
13540	28 W 30	27	13		4	2	-	-
13450	26	5	12		2	3	-	-
13498	2 W 32	17	W 21		3	3	.	-
13528	2	5	27		3	3	-	-
13443	29 W 33	17	12		3	2	-	-
13537	9 W 30	13	13		3	2	-	-
13527	1 W 30	8	13		3	2	-	-
13520	10 28	40	12		4	-	-	-
13558	1	7	12		3	-	-	-
13484	1 W 32	8	12		3	-	-	-
13456	2 3	15	13		3	-	-	-
13587	1 W 30	37	13		3	-	-	-
13532	2 2	5	13		2	-	-	-
13463	1 W 33	W 21	13		2	-	-	-
13497	26	5			2	-	-	-

3. PBL als Testzellen

PBL Nr.	HLA-Phänotyp				Antiserum-Verdünnung 1:8
13611	1	29	8	12	4
13645	1	2	8	12	4
13647	1	2	8	12	4
13648	1	2	8	12	4
13686	10	11	40	12	4
13719	3	11	14	12	4
13723	1	W 23	8	12	4
13724	1	W 23	8	12	4
13725	1	W 23	8	12	4
13787	1	2	8	12	4
13881	2	9	W 35	12	4
13869	2		W 16	12	4
13918	W 24	26	W 38	12	4
13928	2	25		12	4
13929	2	W 30	W 21	12	4
13937	28	W 24		12	4
13965	2		15	12	4
13966	2	W 32	7	12	4
14006	3	29	18	12	4
14013	1	2	W 41	12	4
14020	1	2	8	12	4
13703	9	W 33	W 35	13	4
13691	29	W 33	14	12	3
13715	1	10	8	12	3
13946	2	W 24	40	12	3
13649	2	3	27	13	3
13704	9	W 33	W 35	13	3
13846	2		8	27	3
13685	2	11	40	12	2
13731	2		W 21	12	2
13866	1		14	12	2
13651	1	2	8	13	2
13834	1	W 30	8	13	2
13695	1	1	5	27	2
13867	1		17		2

Das Antiserum 6 reagierte im Mikrozytotoxizitätstest in der Verdünnungsstufe 1:8 am stärksten mit Testzellen, die die Eigenschaft HLA-B 12 besaßen.

Die Gruppe der Testzellen, die ebenfalls positive Ergebnisse im Test aufweisen, jedoch nicht gleichzeitig HLA-B 12-positiv waren, zeigte vergleichsweise schwächere Reaktionen mit dem Antiserum 6 (Tabelle 19).

Tabelle 19

Testzellen, die mit dem Antiserum 6 reagierten, jedoch nicht die Eigenschaft HLA-B 12 aufwiesen

PBL Nr.	HLA-Phänotyp				Antiserum-Verdünnungen 1:8	1:16	1:32	1:64
36	9	26	7	W 16	4	4	2	-
13539	9	28	27	13	4	4	-	-
13541	W 30	28	27	13	4	4	-	-
28	1	9	15	W 21	4	2	2	-
13540	W 30	28	27	13	4	2	-	-
13703	9	W 33	W 35	13	4	.	.	.
13528	2		27	5	3	3	-	-
13498	2	W 32	17	W 21	3	3	.	-
22	29	W 32	W 35	27	3	2	2	-
13527	1	W 30	8	13	3	2	-	-
13537	W 30	9	13	13	3	2	-	-
13456	2	3	15	13	3	-	-	-
13587	W 30	1	37	13	3	-	-	-
13649	2	3	27	13	3	.	.	.
13704	9	W 33	W 35	13	3	.	.	.
13846	2		8	27	3	.	.	.
13463	1	W 33	27	13	2	-	-	-
13532	2	2	5	13	2	-	-	-
13834	1	W 30	8	13	2	.	.	.
13651	1	2	8	13	2	.	.	.
13695	1	1	5	27	2	.	.	.
13867	1		17		2	.	.	.
13497		26	5		2	-	-	-

Die in Tabelle 19 beschriebene Gruppe von Testzellen kann auf Grund gemeinsamer HLA-Strukturen noch in drei Untergruppen unterteilt werden.

14 Testzellen stimmen in der HLA-Determinante HLA-B 13 überein, 4 Testzellen haben gemeinsam das Antigen HLA-B 27 (nicht B 13), während die restlichen 5 Testzellen (PBL-28, -36, 13497, -13498, -13867) unterschiedliche HLA-Phänotypen haben.

In der Gruppe der positiven LCL-Zellen (Tabelle 18) kommen neben Testzellen mit der Eigenschaft B 12 solche vor, die in der Determinante HLA-A 3 (3 Fälle) übereinstimmen. Eine Ausnahme stellt LCL-IFH-13 mit dem HLA-Phänotyp 2-40/2-40 dar.

Bei der Analyse der Spezifität des Antiserums 6 muß das gesamte Reaktionsmuster der HLA-Antigene auf den Testzellen in Betracht gezogen werden.

Vor allem interessieren die Resultate der HLA-Eigenschaften von positiven Testzellen, die nicht gleichzeitig das Antigen HLA-B 12 auf der Zelloberfläche ausgeprägt hatten.

Anhaltspunkte für das Spezifitätsmuster des Antiserums 6 gibt die Tabelle 20. Sie gibt die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse von Antiserum 6 in der Verdünnung 1:8 wieder.

Tabelle 20

HLA-Antigene der Testzellen und ihre Korrelation mit dem Antiserum 6 in der Verdünnung 1:8

HLA-	Phänotypfrequenz %	a	b	c	d	x^2	r
B 12	22,5	68	3	27	214	185,22	0,77
B 13	9,5	17	13	78	204	10,77	0,18
A 28	5,7	8	10	87	207	1,76	0,07
A W 30	5,7	8	10	87	207	1,76	0,07
A 1	36,4	37	78	58	139	0,25	0,02
A 9	16,4	17	35	78	182	0,14	0,02
B 27	11,1	11	24	84	193	0,01	0,01
B 8	28,8	27	64	68	153	0,03	-0,01
B 5	10,1	9	23	86	194	0,09	-0,01
B 14	6,6	4	17	91	200	1,38	-0,06
A 11	6,3	3	17	92	200	2,40	-0,08
B 18	6,6	2	19	93	198	4,65	-0,12
B 40	14,5	7	39	88	178	5,91	-0,13
A 2	48,4	36	117	59	100	6,78	-0,14
B 15	11,7	4	33	91	184	7,64	-0,15
B W 35	14,5	6	40	89	177	7,71	-0,15
A 3	23,1	9	64	86	153	14,77	-0,21
B 7	22,8	5	67	90	150	24,41	-0,27

		a	b	c	d	p_2
A 29	4,1	9	4	86	213	0,01
A W 32	4,7	10	5	85	212	0,01
B W 21	4,4	7	7	88	210	0,18
A W 23	1,3	3	1	92	216	0,16
A 10	4,4	6	8	89	209	1
A 26	4,7	6	9	89	198	1
A W 33	4,1	5	8	90	209	1
A 25	1,9	3	3	92	214	0,52
B W 16	5,1	4	12	91	205	0,86
B 17	3,8	3	9	92	208	0,94
A W 24	2,5	3	5	92	212	1
B 37	2,5	2	6	93	211	1
B W 38	1,3	1	3	94	214	1
A W 19	0,6	1	1	94	216	1
B W 41	0,9	1	2	94	215	1

Eliminiert man aus der Gruppe der lysierten Testzellen die, welche das Antigen HLA-B 12 ausgeprägt haben und berechnet erneut die X^2-Werte bzw. r-Werte für die möglichen Assoziationen, so erhält man folgende Werte (Tabelle 21):

Tabelle 21

Berechnung der Korrelationen von HLA-Antigenen und Antiserum 6 nach Weglassung HLA-B 12-positiver Testzellen

HLA-	a	b	c	d	X^2	r
A 1	8	78	19	136	0,48	-0,04
A 3	5	64	22	150	1,52	-0,07
B 8	4	64	23	150	2,69	-0,10
A 2	8	114	19	100	5,36	-0,14
B 7	2	66	25	148	6,50	-0,16

	a	b	c	d	p_2
B 13	14	13	13	201	2,2 E-8
A W 30	6	9	21	205	1
B W 21	3	6	24	208	1
A W 33	3	8	24	206	1
A W 32	2	4	25	210	1
A 28	3	10	24	204	1
A 9	6	34	21	170	1
A 10	2	7	25	207	1
A 26	2	9	25	205	1
B 17	2	9	25	205	1
B W 16	2	12	25	202	1
A 29	1	4	26	210	1
B 37	1	6	26	208	1

Die Assoziation zwischen dem Antiserum 6 und dem Antigen HLA-B 13 ist statistisch wahrscheinlich.

Um zu prüfen, ob noch weitere Assoziationen zwischen dem Antiserum 6 und HLA-Eigenschaften nachweisbar sind, müssen die Werte in Tabelle 22 verglichen werden.

Tabelle 22

Reaktionsmuster des Antiserums 6 mit Testzellen, die nicht das Antigen HLA-B 12 oder -B 13 exprimiert hatten

HLA-	a	b	c	d	x^2	r
A 2	4	104	9	97	2,14	-0,10
	a	b	c	d	p_2	
B W 21	3	6	10	195	1	
A W 32	2	4	11	197	1	
B 27	4	23	9	178	1	
B 8	1	60	12	141	0,14	
A 10	2	7	11	194	1	
A 26	2	9	11	192	1	
B 17	2	9	11	192	1	
B 5	3	21	10	180	1	
B 7	2	63	11	138	0,36	
A 1	3	75	10	126	0,46	
B W 16	2	12	11	189	1	
B 40	1	38	12	163	0,54	
A 3	3	60	10	141	0,86	
A 29	1	4	12	210	1	
B 15	1	31	12	170	0,78	
B W 35	2	40	11	161	1	
A 9	2	32	11	169	1	
B 18	1	19	12	182	1	

Tabelle 22 belegt, daß beim Antiserum 6 in der Verdünnung 1:8 außer den statistisch signifikanten Korrelationen mit den Antigenen HLA-B 12 und HLA-B 13 keine statistisch gesicherte Kontingenz mit anderen HLA-Eigenschaften mehr nachgewiesen werden konnte.

In Abbildung 2 sind die Korrelationen des Antiserums 6 mit HLA-A- und HLA-B - Eigenschaften graphisch dargestellt. Diese Graphik gibt ergänzend zu den statistischen Maßzahlen noch folgende Informationen:

- Prozentualer Anteil der Testzellen, die z.B. als HLA-B 12 typisiert waren und durch das Antiserum 6 in der Verdünnung 1:8 lysiert wurden.
- Prozentualer Anteil dieser positiven Testreaktionen am gesamten Reaktionsspektrum des Antiserums 6.
- Von den HLA-B 13-positiven Testzellen sind nur die aufgeführt, die nicht gleichzeitig im HLA-Muster die Eigenschaft HLA-B 12 hatten.

Die Prozentangaben für alle anderen HLA-Eigenschaften, mit Ausnahme von HLA-B 12, gelten für Testzellen, die nicht gleichzeitig HLA-B 12- oder HLA-B 13-positiv waren. D.H. positive Testreaktionen von HLA-Eigenschaften, die auf Assoziationen mit den Antigenen HLA-B 12 oder HLA-B 13 im HLA-Muster der Testzellen beruhen, sind, da sie weniger informativ sind, nicht abgebildet.

Wie bereits an Hand der statistischen Berechnungen dargelegt wurde, ist das Antiserum 6 in erster Linie für das Antigen HLA-B 12 spezifisch.

95,7% aller HLA-B 12-positiven Testzellen wurden durch das Antiserum 6 lysiert. Das sind 71,5% aller positiven Reaktionen des Antiserums 6. Von den HLA-B 13-positiven Testzellen wurden 52% durch das Antiserum 6 identifiziert. Das sind 14,7% aller positiven Reaktionen des Antiserums 6.

Abbildung 2 Positive Reaktionen des Antiserums 6 (1 : 8) mit PBL und LCL als Testzellen

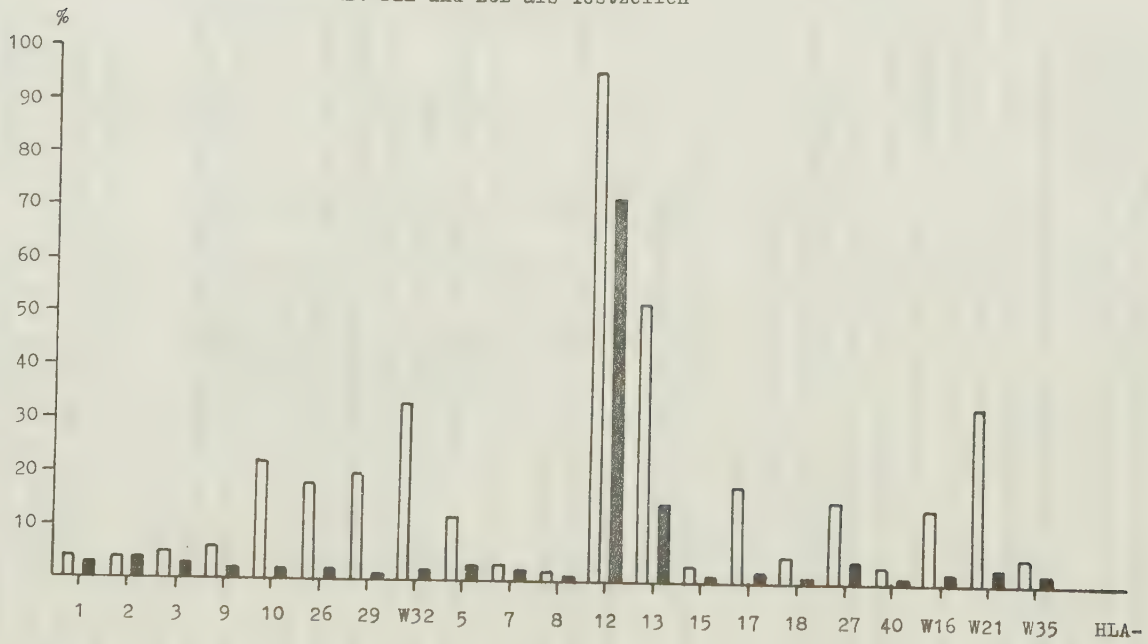


Abb. 2: Positive Reaktionen des Antiserums 6 in der Verdünnung 1:8 mit LCL und PBL als Testzellen.

3.1.2. Analyse der Spezifität des Antiserums 6 in den Verdünnungsstufen 1:16, 1:32 und 1:64

Noch zu erörtern bleibt, inwieweit das Antiserum 6 in den Verdünnungsstufen 1:16, 1:32 und 1:64 für die Typisierung von HLA-B 12-positiven Testzellen geeignet ist.

In Tabelle 23 sind die Häufigkeiten der Kontingenztafeln für PBL und LCL mit der Eigenschaft HLA-A 1, A 2, A 3, A 9, B 12 oder B 13 aufgelistet.

Tabelle 23

HLA-Antigene der Testzellen und ihre Korrelation mit dem Antiserum 6 in der Verdünnung 1:16

HLA - Eigenschaft	a	b	c	d	r
A 1	18	26	33	60	0,05
A 2	17	40	34	46	-0,12
A 3	6	30	45	56	-0,25
A 9	14	18	37	68	0,07
B 12	37	4	14	82	0,72
	a	b	c	d	P_2
B 13	8	13	43	73	0,007

92,4% der HLA-B 12-positiven Testzellen wurden durch das Antiserum 6 in der Verdünnung 1:16 lysiert. Das sind 72,5% aller positiven Reaktionen.

Der Korrelationskoeffizient r beträgt für das Antigen HLA-B 12 r = 0,72. D.h. das Antiserum 6 ist auch in der Verdünnung 1:16 für die Eigenschaft HLA-B 12 hoch spezifisch.

Von den HLA-B 13-positiven Testzellen wiesen in der Antiserum-Verdünnung 1:16 27% der untersuchten PBL und LCL noch positive Reaktionen auf. Dies entspricht einem Anteil von 9,8% am gesamten Reaktionsspektrum des Antiserums in der Verdünnung 1:16.

Der Anteil der positiven Testzellen ohne Antigen HLA-B 12 oder HLA-B 13 beträgt 17,7% aller positiven Reaktionen.

Die Reaktionsstärke des Antiserums 6 in der Verdünnung 1:16 ist vergleichbar mit der in der Verdünnung 1:8. In der Verdünnung 1:8 waren 70,5% der positiven Reaktionen vierfach positiv, in der Verdünnung 1:16 waren es 64,7%.

Die Verdünnungsstufen 1:32 und 1:64 des Antiserums 6 sind nicht mehr von Interesse für die HLA-Typisierung. Die Anzahl der "falsch negativen" Ergebnisse von HLA-B 12-positiven Testzellen (Tabelle 18) erübrigt eine weitere detaillierte Analyse der Resultate.

3.1.3. Untersuchung des Antiserums 6 auf mögliche Spezifität für B-Zell-Eigenschaften

Das Antiserum 6 wurde weiterhin mit Thrombozyten absorbiert. Damit war die Möglichkeit geschaffen, folgende Fragen zu untersuchen:

1. Weist das so absorbierte Antiserum 6 noch Antikörper auf, die für HLA-A oder HLA-B-, im besonderen für HLA-B 12, - Genprodukte spezifisch sind?

2. Sind im Antiserum 6 außerdem Antikörper vorhanden, die für B-Zell-Eigenschaften spezifisch sind?

Insgesamt wurden 81 PBL im für B-Zellen modifizierten Mikrozytotoxizitätstest untersucht (Tabelle 24).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen ließen keine Spezifität des Antiserums 6 für B-Zell-Eigenschaften erkennen. Weiterhin ist aus Tabelle 24 ersichtlich, daß HLA-B 12 positive Testzellen mit dem absorbierten Antiserum 6 nicht mehr reagierten.

Tabelle 24

Reaktion der PBL mit Antiserum 6 und 7 im modifizierten Mikrozytotoxizitätstest

PBL Nr.	HLA-Phänotyp HLA-A und -B	- DRW		Antiserum 6	Antiserum 7
1	9-12/2-12	6	7	-	•
2	1-8/3-W 22	3	6	-	-
3	9-12/1-8	6	3	-	-
4	9-12/1-8	6	3	-	-
5	2-12/3-W 22	6	7	-	•
6	2-12/1-8	3	7	-	•
7	1-8/2-13		3	-	-
8	2 3 7 15		2	-	-
9	29 W 32 27 W 35	1	7	-	-
10	W 24 26 7 12		5	-	-
11	1 2 8 13		3	-	-
12	2 3 7 15		2	-	-
13	11 26 7 27	3	4	-	-
14	W 30-18/3-15	3		-	-
15	9-W 21/2-17	1	8	-	-
16	9-W 21/11-17	1	5	-	-
17	9-W 21/3-7	1	4	-	-
18	2-17/11-17	5	8	-	-
19	11 W 24 W 35	6		-	-
20	1 2 7 13	2	5	-	-
21	3 W 32 40	6		•	-
22	28 W 32 5 W 35	4		-	-
23	2 25 15 40			-	4
24	2 W 23 12 W 35	6	7	-	4
25	29-7/2-40	2	6	2	1
26	1-8/9-18	2	7	-	1
27	2-40/1-8	6	2	-	-
28	2-40/1-8	6	2	1	-
29	29-7/1-8	2		2	-
30	29-7/9-18	2	7	-	-
31	9 5 40	2	6	-	-
32	2 9 12 18	1		-	-
33	3 11 27 40	4	6	-	-
34	2-13/3	3		-	-
35	2-5/W 23-27	5	1	-	-
36	2-13/W 23-27	1		-	-
37	2-13/W 23-27	1		-	-
38	3/2-5	3	5	-	-
39	3/2-5	3	5	1	-
40	3/W 23-27	3	1	1	-
41	3-W 35/2-12			1	-
42	1-8/2-12			-	-
43	3-W 35/1-8			-	-
44	2-12/2-12			-	•
45	3-W 35/2-12			-	-

Tabelle 24 Fortsetzung

PBL Nr.	HLA-Phänotyp HLA-A und -B	- DRW	Antiserum 6	Antiserum 7
46	2 26 7 W 21		-	-
47	29-12/3-12		-	-
48	W 32-27/1-8	3	-	-
49	3-7/2-W 22	2 4	-	-
50	W 32-27/3-7	2	-	-
51	1-8/3-7	3 2	-	-
52	1-8/2-W 22	3 4	-	-
53	10-7/3-W 22	6 2	-	-
54	9-15/10-7	6 6	-	-
55	9-15/3-W 22	6 2	-	-
56	2-15/3-W 22	6 2	-	-
57	2-15/3-W 22	6 2	.	-
58	3-18/2	3 7	-	-
59	3-18/3-7	3 6	.	-
60	2 9 12 17	7	-	2
61	3-7/29-7	1 4	-	-
62	1 W 32 5 12	6 2	-	-
63	2 3 12 18	3 6	-	-
64	1 2 12	6	-	-
65	3 W 32 18 5	2 3	-	-
66	3 W 32 18 5	2 3	-	-
67	2 W 32 12 5	2 6	-	-
68	2 W 32 12 5	2 6	-	-
69	2-27/7	4 8	-	-
70	9-40/1-7	6	-	-
71	2-27/9-40		-	-
72	2-27/1-7	4 6	-	-
73	3 29 7 12	4 6	-	-
74	W 32 40	3 7	-	2
75	2 13	3 6	-	-
76	11-W 22/3	3	-	-
77	2-12/29-5	3	-	-
78	3/2-12	3 3	-	-
79	3/2-12	3 3	-	-
80	11-W 22/29-5		-	-
81	2 18 40	1 5	-	1
82	1 2 5 7	2 3	-	-
83	1 2 5 7	3 6	-	-

Tabelle 24 Fortsetzung

PBL Nr.	HLA-Phänotyp HLA-A und -B					- DRW		Anti-serum 6	Anti-serum 7
84	2	11	27	W 51	7	5		.	1
85	1	28	8	40	3	5		.	-
86	3	9	18		1	3		.	-
87	3	9	5		6			.	-
88	2	29	12	17	7			.	-
89	1		8		2	3		.	-
90	2		7	15	6	6		.	-
91	1		8	15	2	6		.	-
92	1	2	8	7	2	6		.	1
93	1	2	8	7	3	6		.	-
94	1	2	8	7	2	6		.	-
95	1		8	15	3	6		.	-
96	1		8	15	3	6		.	-
97	1	2	12	7	2	4		.	-
98	2	25	12		4	5		.	-
99	2	W 23	13	17	1			.	-
100	2	3	5		3	5		.	-
101	1	2	8	40	2	3		.	-
102	26		37	W 38	1	5		.	-
103	2	10	5	14	4	5		.	-
104	2	25	W 21	W 35	7			.	2
105	2	2	12	40	5	7		.	1
106	W 24	29	15	15	4	6		.	-
107	2	29	12	15	4	5		.	-
108	2	29	40	15	4	7		.	-
109	W 32	W 23	7	12	6			.	-
110	2	23	7	13	5	6		.	-
111	2	W 31		18	3	7		.	2

3.2. Antiserum 7

Das Antiserum 7 repräsentiert ein weiteres Beispiel für die Arbeitshypothese von der Herstellung spezifischer, heterologer Anti-HLA-Antiseren.

Das Antiserum 7 entstand durch Immunisierung von Kaninchen mit LCL-IFH-16. Absorbiert wurde dieses Antiserum in gleicher Weise wie Antiserum 6 mit LCL-IFH-18.

3.2.1. Analyse des Antiserums7 auf Spezifität für HLA-A bzw. HLA-B - Eigenschaften

Zur Charakterisierung des Antiserums 7 wurden HLA-typisierte PBL und LCL im Mikrozytotoxizitätstest mit dem Antiserum 7 untersucht.

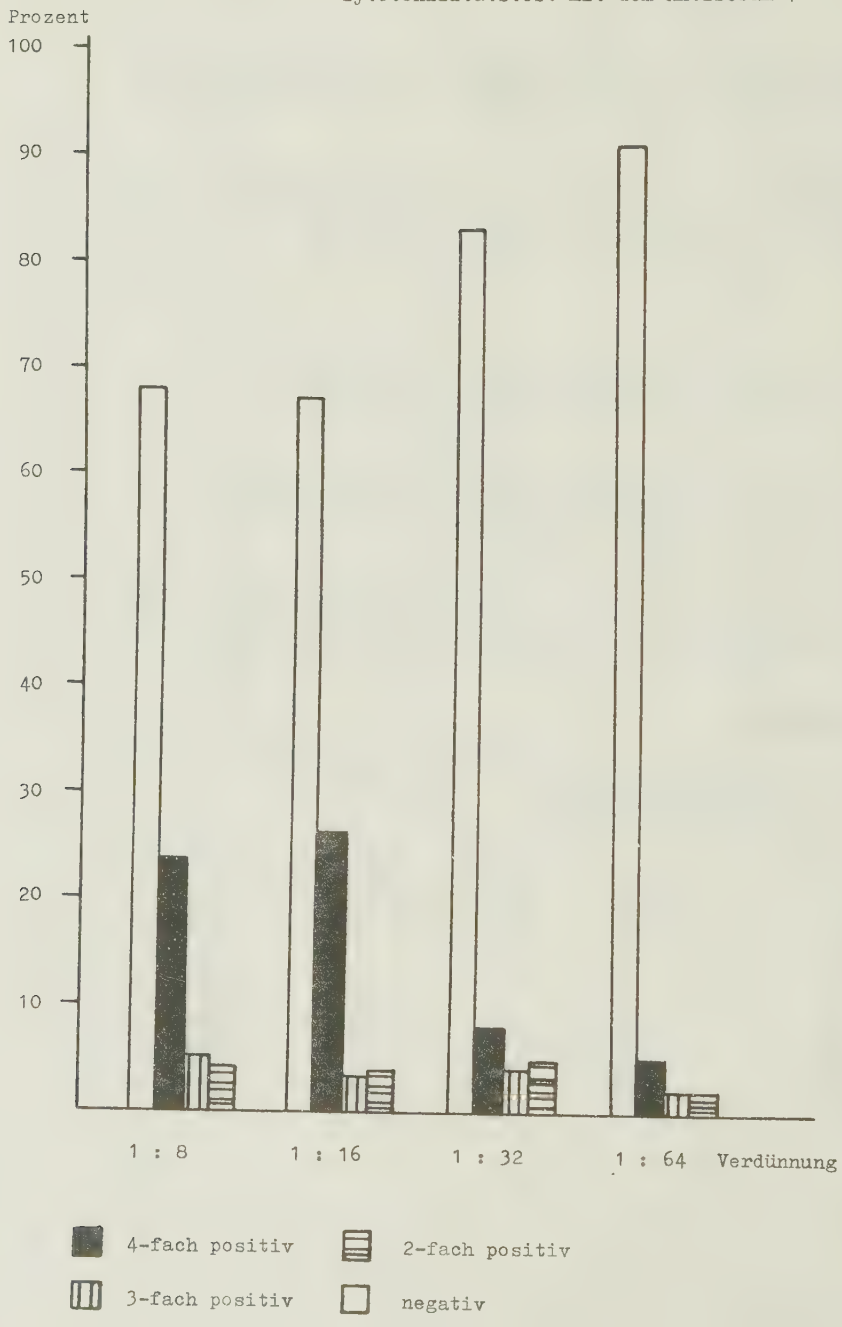
In Tabelle 25 sind die Untersuchungen mit PBL und LCL aufgelistet und in Abbildung 3 graphisch dargestellt.

Tabelle 25

Anzahl der Untersuchungen mit dem Antiserum 7 im Mikrozytotoxizitätstest

Testzellen	getestet	2-4fach +	negativ	Verdünnung
PBL	217	67	150	1: 8
LCL	21	10	11	1: 8
PBL	123	39	84	1:16
LCL	21	9	12	1:16
PBL	124	19	105	1:32
LCL	21	6	15	1:32
PBL	123	8	115	1:64
LCL	21	5	16	1:64

Abbildung 3 Reaktionen aller Testzellen im Mikrozytotoxizitätstest mit dem Antiserum 7



Um die Spezifität des Antiserums 7 zu ermitteln, werden zunächst die positiven Testergebnisse analysiert.

In der Tabelle 26 sind die positiven Testzellen aufgelistet. Die Reihenfolge der Testzellen entspricht der Stärke der positiven Reaktion mit Antiserum 7 in den Verdünnungen 1:8 - 1:64 bzw. bei der Verdünnung 1:8 bei PBL, die nur in dieser Verdünnung des Antiserums untersucht wurden.

Tabelle 26

Liste der positiven Testzellen im Mikrozytotoxizitätstest mit dem Antiserum 7

1. LCL als Testzellen

LCL-IFH-	HLA-Phänotyp	Antiserum - Verdünnungen 1:8	1:16	1:32	1:64
16	29-12/2-12	4	4	4	4
22	25-12/1-8	4	4	4	3
23	25-12/1-8	4	4	4	3
10	2-12/2-12	4	4	4	2
5	2-12/2-12	4	4	3	2
8	10-W 16/3-W 21	4	4	2	-
17	2-15/2-15	4	3	-	-
13	2-40/2-40	3	2	-	-
19	3-7/10-18	3	2	-	-
6	1-8/1-8	2	-	-	-

Tabelle 26 Fortsetzung

2. PBL als Testzellen

PBL Nr.	HLA-Phänotyp				Antiserum - Verdünnungen 1:8	1:16	1:32	1:64
1	2	W 19	13	12	4	4	4	4
29	2	9	13	12	4	4	4	4
15	26		W 16	12	4	4	4	4
12	9		15	12	4	4	4	4
11	9	10	7	12	4	4	4	4
3	2	3	W 16	12	4	4	4	4
5	2	9	17	12	4	4	4	3
13486	9	29	W 21	12	4	4	4	2
35	2	28	14	12	4	4	3	-
13471	3	9	8	12	4	4	3	-
13487	9	1	5	12	4	4	3	-
13453	2	26	5	12	4	4	3	-
13482	1	W 32	8	12	3	4	3	-
13476	9		W 16	12	4	4	2	-
13478	1	9	8	12	4	4	2	-
13483	1	W 32	8	12	4	4	2	-
13485	1	W 32	8	12	4	4	2	-
13499	2	W 30	W 35	12	4	4	2	-
13514	9	10	18	12	4	4	2	-
13444	1	29	8	12	4	4	-	-
13448	1	2	8	12	4	4	-	-
13470	2	9	15	12	4	4	-	-
13479	1	9	8	12	4	4	-	-
13496	2		40	12	4	4	-	-
13520	10	28	40	12	4	4	-	-
13556	1	W 32	8	12	4	4	-	-
13559	1		27	12	4	4	-	-
13561	1		27	12	4	4	-	-
13562	1		27	12	4	4	-	-
13527	1	W 30	8	13	4	4	-	-
6	3	25	W 35	W 16	4	4	-	-
13488	9	29	7	12	4	3	-	-
13480	1	W 32		12	4	3	-	-
13445	28	2	13	12	4	2	-	-
13553	3	W 32	37	12	3	3	-	-
13558	1		7	12	3	3	-	-
22	29	W 32	27	W 35	3	2	-	-
13494	3	9	7	18	2	2	-	-
13540	28	W 30	27	13	-	2	-	-

Tabelle 26 Fortsetzung

PBL Nr.	HLA-Phänotyp				Antiserum - Verdünnungen 1:8	1:16	1:32	1:64
13443	29	W 33	17	12	4	-	-	-
13451	2		5	12	4	.	-	-
13460	2	3	40	12	4	-	-	-
13484	1	W 32	8	12	4	-	-	-
13524	1	28	8	12	4	-	-	-
13474	3	9	8	7	4	-	-	-
13452	2	26	5	12	3	-	-	-
13541	28	W 30	27	13	3	-	-	-
7	2		15	27	3	-	-	-
28	1	9	15	W 21	3	-	-	-
13501	3	28	15	W 35	3	-	-	-
13497		26	5		2	-	-	-
13528		2	5	27	2	-	-	-
13539	9	28	27	13	2	-	-	-
13555	1	3	8	37	2	-	-	-

3. PBL als Testzellen

PBL Nr.	HLA-Phänotyp				Antiserum - Verdünnung 1:8
13787	1	2	8	12	4
13869	2		W 16	12	4
13918	W 24	26	W 38	12	4
13928	2	25		12	4
13929	2	W 30	W 21	12	4
13937	28	W 24		12	4
13965	2		15	12	4
13966	2	W 32	7	12	4
14006	3	29	18	12	4
14013	1	2	W 41	12	4
14020	1	2	8	12	3
13881	2	9	W 35	12	2
13946	2	W 24	40	12	2
14003	2	W 32	W 21	12	2

Aus der Gruppierung der positiven Testzellen in Tabelle 26 geht hervor, daß möglicherweise eine hohe Korrelation zwischen positivem Testresultat und Testzellen mit der Eigenschaft HLA-B 12 besteht.

Um dies zu überprüfen, werden zunächst alle positiven Resultate von Testzellen aufgeführt, die nicht HLA-B 12 exprimiert hatten (Tabelle 27).

Tabelle 27

Charakteristik der positiven Testzellen, die nicht gleichzeitig das Antigen HLA-B 12 aufweisen

a) LCL

LCL-IFH-	HLA-Phänotyp	Antiserum - Verdünnungen 1:8	1:16	1:32	1:64
8	10-W 16/3-W 21	4	4	2	-
17	2-15/2-15	4	3	-	-
13	2-40/2-40	3	2	-	-
19	3-7/10-18	3	2	-	-
6	1-8/1-8	2	-	-	-

b) PBL

PBL Nr.	HLA-Phänotyp				Antiserum - Verdünnungen 1:8	1:16	1:32	1:64
6	3	25	W 35	W 16	4	4	-	-
13527	1	W 30	8	13	4	4	-	-
13474	3	9	7	8	4	-	-	-
22	29	W 32	W 35	27	3	2	-	-
7	2		15	27	3	-	-	-
13541	28	W 30	13	27	3	-	-	-
28	1	9	15	40	3	-	-	-
13501	3	28	15	W 35	3	-	-	-
13494	3	9	7	18	2	2	-	-
13497		26	5		2	-	-	-
13528	2		5	27	2	-	-	-
13539	9	28	13	27	2	-	-	-
13555	1	3	8	37	2	-	-	-

Um eine Aussage über die Spezifität des Antiserums 7 treffen zu können, sind alle Reaktionen des Antiserums 7 zu untersuchen.

Tabelle 28 informiert über die statistische Analyse der 2 x 2 Kontingenztafeln von Antiserum 7 in der Verdünnung 1:8 und den untersuchten HLA-Eigenschaften.

Tabelle 28

HLA-Antigene der Testzellen und ihre Korrelation mit dem Antiserum 7 in der Verdünnung 1:8

HLA-	Phänotyp-frequenz %	a	b	c	d	x^2	r
B 12	25,2	59	2	18	159	155,28	0,807
A 9	17,8	18	25	59	136	2,17	0,095
B 27	7,4	8	10	69	151	1,30	0,073
A 1	31,4	25	51	52	110	0,01	0,008
B 13	9,5	7	16	70	145	0,04	-0,013
B 8	25,6	19	43	58	119	0,09	-0,019
B 5	9,1	6	16	71	145	0,28	-0,034
B 15	11,6	7	21	70	140	0,78	-0,057
B 40	11,9	5	24	72	137	3,44	-0,120
A 3	23,9	12	46	65	115	4,76	-0,141
A 2	51,2	31	93	46	68	6,39	-0,163
B W 35	15,3	5	32	72	129	7,10	-0,172
B 7	26,4	7	57	70	104	18,34	-0,277
		a	b	c	d	p_2	
A W 32	5,4	10	3	67	158	1,8	E-3
A 29	3,3	7	1	70	160	3,6	E-3
A 28	5,8	8	6	69	155	0,08	
B 14	4,5	1	10	76	151	0,14	
A 25	2,5	4	2	73	159	0,16	
A 10	4,1	5	5	72	156	0,36	
B W 21	4,1	5	5	72	156	0,36	
A W 30	4,5	5	6	72	155	1	
B W 16	6,2	6	9	71	152	1	
B 17	4,1	2	8	75	153	0,62	
A 26	6,2	5	10	72	151	1	
B 18	5,4	4	9	73	152	1	
A W 24	2,9	3	4	74	157	1	
B 37	2,5	2	4	75	157	1	
A W 19	0,8	1	1	76	160	1	
B W 38	1,2	1	2	76	159	1	
B W 41	1,2	1	2	76	159	1	
A W 33	1,2	1	2	76	159	1	

Die positive Korrelation zwischen Antiserum 7 und dem Antigen HLA-B 12 ist durch den Korrelationskoeffizienten r = 0,807 statistisch gesichert.

Zu prüfen bleibt, inwieweit das Antiserum 7 Kreuzreaktionen mit dem Antigen HLA-B 13 oder Reaktionen mit anderen HLA-Eigenschaften eingeht.

In Tabelle 29 sind die Werte der 2 x 2 Kontingenztafeln für die Analyse weiterer Assoziationen des Antiserums 7 mit HLA-Eigenschaften angegeben.

Tabelle 29

HLA-Antigene der Testzellen, die nicht HLA-B 12 positiv sind und ihre Korrelationen mit dem Antiserum 7

HLA-Eigenschaft	a	b	c	d	X^2	r
A 3	7	46	11	113	0,76	0,06
A 1	4	50	14	109	0,64	-0,06
B 7	3	57	15	102	2,65	-0,12
A 2	4	93	14	66	8,58	-0,22
	a	b	c	d	p_2	
B 27	5	10	13	149	1	
A 28	3	6	15	153	1	
A 10	2	5	16	154	1	
B 15	4	21	14	138	1	
A W 30	2	6	16	153	1	
A 29	1	1	17	158	0,38	
A 9	4	25	14	134	1	
B 13	3	16	15	143	1	
B 8	4	43	14	116	0,9	
B 18	2	9	16	150	1	
B W 16	2	9	16	150	1	
B W 35	3	32	15	127	1	
A 25	1	2	17	157	1	
B 40	2	24	16	135	0,96	
B 5	2	15	16	144	1	
A W 32	1	3	17	156	1	
B 37	1	4	17	155	1	
B W 21	1	5	17	154	1	
A 26	1	9	17	150	1	

Die ermittelten Korrelationskoeffizienten und p_2- Werte für das Antiserum 7 und HLA-Eigenschaften (Tabelle 29), mit Ausnahme von HLA-B 12, liegen alle außerhalb des statistischen Signifikanzbereiches. D.h. nur die Korrelation des Antiserums 7 mit dem Antigen HLA-B 12 ist statistisch gesichert.

In Abbildung 4 sind alle Beziehungen des Antiserums 7 in der Verdünnung 1:8 mit den untersuchten HLA-Eigenschaften dargestellt. Wie bereits zu Abbildung 2 ausgeführt, ergänzt die graphische Darstellung die statistische Analyse.

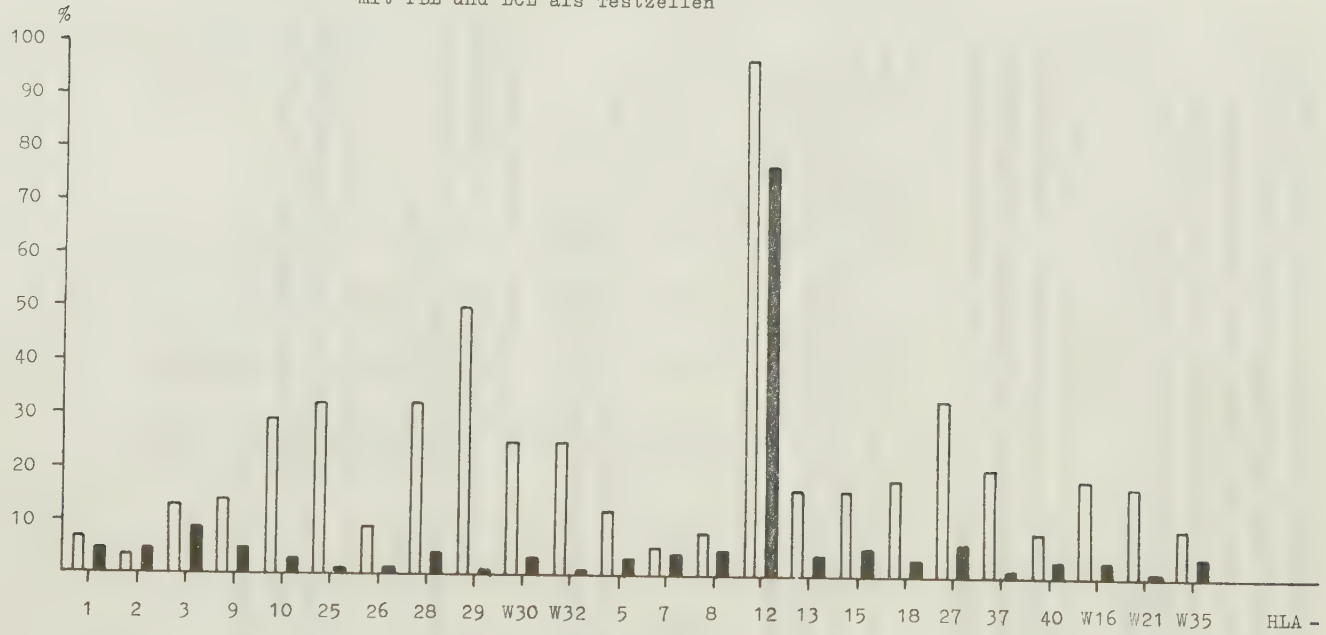
96,7% der HLA-B 12-positiven Testzellen wurden durch das Antiserum 7 in der Verdünnung 1:8 lysiert. Das sind 76,6% aller positiven Reaktionen. Von den HLA-B 13-positiven Testzellen wurden hingegen nur 15,8% lysiert. Das sind 3,9% aller positiven Reaktionen.

3.2.2. Analyse der Spezifität des Antiserums 7 in den Verdünnungsstufen 1:16, 1:32 und 1:64

Das Antiserum 7 lysierte in der Verdünnungsstufe 1:16 86,7% der HLA-B 12-positiven Testzellen. Diese Reaktionen machen 81,2% aller positiven Reaktionen aus. Die "falsch positiven" Reaktionen betragen demnach 18,8%.

Die Verdünnungsstufen 1:32 und 1:64 des Antiserums 7 eignen sich nicht mehr zur HLA-Typisierung. In diesen Fällen erhöhte sich der Anteil der "falsch negativen", HLA-B 12-positiven Testzellen erheblich (Tabelle 26).

Abbildung 4 Positive Reaktionen des Antiserums 7 (1 : g) mit PBL und LCL als Testzellen



3.2.3. Untersuchung der B-Zell-Spezifität

Da möglicherweise die "falsch positiven" Ergebnisse des Antiserums 7 auf B-Zell-spezifische Antikörper zurückzuführen sind, wurde das Antiserum 7 unter diesem Gesichtspunkt weiter untersucht. Dazu wurde das Antiserum 7 mit Thrombozyten absorbiert und anschließend gegen 47 PBL ausgetestet (Tabelle 30).

Tabelle 30

Untersuchung des mit Thrombozyten absorbierten Antiserums 7 auf restliche Aktivität gegenüber HLA-A oder HLA-B-Antigenen

PBL Nr.	HLA-Phänotyp				Antiserum 7
15446	10		W 19	5	-
15447	2	25	5	W 35	-
15448	1	9	7	8	-
15449	1	W 24	8	15	3
15451	W 23	W 32	W 21	W 16	-
15453	11	28	27		2
15548	2		13	15	1
15558	11	28	13	W 35	-
15552	2		12	40	-
15553	2	9	15	27	-
15554	2	9	27	40	-
15555	2	3	5		-
15556	1	2	8	W 16	-
15559	W 31	W 32	7	W 35	-
15560	W 32	2	W 35	W 16	2
15561	1	2	7	W 38	-
15562	1	W 31	7	7	-
15563	3	26	8	W 16	-
15564	2	11	W 38	27	-
15565	1	2	15	W 22	-
15566	2	26	5	12	-
15567	3		5	13	-
15568	1	25	W 21		-
15569	2	3	5	15	-
15570	2	28	8	12	-
15571	1	3	W 35		-
15573	2		W 35		-
15574	9		14	18	-

Tabelle 30 Fortsetzung

15576	1	9	7	8	-
15577	3	W 32	27	40	-
15581	2	3	7	12	-
15582	W 24	26			-
15583	2	W 24	12		-
15584	3	26			-
15197	26	W 38	W 49		-
15597	2	W 32	5	27	-
15598	1	W 32	5		-
15599	11	2	W 53	27	-
15630	1	W 32	17	W 21	-
15631	W 23	25		W 21	-
15632	3	28	12	W 35	-
15633	2	W 24	5	12	-
15634	W 24	W 32	5	27	-
15645	3	W 24	5	12	-
15646	2	10	5	14	-
15650	W 24	W 32	7	18	-
15651	2	3	18	W 44	-

Vier der untersuchten Fälle hatten schwach positive Resultate.

Zur Analyse auf B-Zell-Spezifität des Antiserums 7 wurden insgesamt 107 PBL, die in den B-Lymphozyten angereichert waren, im modifizierten Mikrozytotoxizitätstest untersucht (Tabelle 24). Diese PBL waren in den DRW-Eigenschaften 1-8 typisiert worden. PBL ohne diesbezügliche Angaben konnten bisher noch nicht charakterisiert werden. Es ist jedoch auszuschließen, daß diese PBL eine der genannten DRW-Eigenschaften exprimiert hatten.

In Tabelle 31 ist die B-Zell-Charakteristik der Testzellen aufgeführt.

Tabelle 31

B-Zell-Charakteristik der untersuchten Testzellen

DRW 1	14	
DRW 2	29	
DRW 3	38	(2 Zellen homozygot)
DRW 4	16	
DRW 5	17	
DRW 6	40	(2 Zellen homozygot)
DRW 7	13	
DRW 8	3	
Blank	44	

12 Testzellen zeigten mit dem Antiserum 7 im modifizierten Mikrozytotoxizitätstest z.T. sehr schwache und auch starke Reaktionen (Tabelle 32).

Tabelle 32

Positive Testergebnisse im modifizierten Mikrozytotoxizitätstest

PBL Nr.	HLA-Charakteristik HLA-A und -B	- DRW		Stärke der Reaktion
23	2, 25, 15, 40	.	.	4
24	2, W 23, 12, W 35	6	7	4
25	29, 7, 2, 40	2	6	1
26	1-8/9-18	2	7	1
60	2, 9, 12, 17	7	.	2
74	W 32, 40	3	7	2
81	2, 18, 40	1	5	1
84	2, 11, 27, W 51	7	5	1
92	1, 2, 8, 7	2	6	1
104	2, 25, W 21, W 35	7	.	2
105	2, 2, 12, 40	5	7	1
111	2, W 31, 18	3	7	2

Bei dieser Gruppierung der positiven Testzellen fällt auf, daß Testzellen mit der Eigenschaft DRW 7 häufiger sind. Der Vergleich der positiven und negativen Testresultate von Testzellen mit dieser Eigenschaft ergibt:

Kontingenztafel	Test +	Test -	
DRW 7 +	8	5	13
DRW 7 -	4	90	94
	12	95	107

D.h. 61% der getesteten Testzellen mit der Eigenschaft DRW 7 konnten mit dem Antiserum 7 identifiziert werden. Das sind 66% aller positiven Ergebnisse.

Der p_2-Wert im FISHER-Test beträgt $3{,}2 \times 10^{-6}$. Demnach ist eine Assoziation des Antiserums 7 mit der Eigenschaft DRW 7 sehr wahrscheinlich.

3.3. Vergleich von Antiserum 6 und 7

Abschließend werden die Untersuchungsergebnisse der Antiseren 6 und 7 einander gegenübergestellt. Dabei soll geprüft werden, inwieweit die Testergebnisse beider Antiseren übereinstimmen.

Die Resultate der beiden Antiseren 6 und 7 in der Verdünnung 1:8 sind in Tabelle 33, die der Verdünnungsstufe 1:16 in Tabelle 34 dargestellt.

Von insgesamt 230 vergleichbaren Testzellen bei der Verdünnung 1:8 hatten 192 (83,4%) übereinstimmende Ergebnisse im Mikrozytotoxizitätstest.

Tabelle 33

Vergleich der Reaktionsmuster von Antiserum 6 und Antiserum 7 in der Verdünnung 1:8

	4 +	3 +	2 +	-
Antiserum 6				
209 Untersuchungen mit PBL	49	12	7	141
21 Untersuchungen mit LCL	8	-	1	12
insgesamt	57	12	8	153
%	24,8	5,2	3,5	66,5
Antiserum 7				
209 Untersuchungen mit PBL	45	10	8	146
21 Untersuchungen mit LCL	7	2	1	11
insgesamt	52	12	9	157
%	22,6	5,2	3,9	68,3
übereinstimmende Reaktionen	45	2	1	144
%	19,6	0,9	0,4	62,6
übereinstimmend positiv, unterschiedlich stark positiv	15 (6,5%)			
unterschiedliche Reaktionen	23 (10 %)			

Tabelle 34

Vergleich der Reaktionsmuster von Antiserum 6 und Antiserum 7 in der Verdünnung 1:16

	4 +	3 +	2 +	-
Antiserum 6				
135 Untersuchungen mit PBL	27	6	8	73
21 Untersuchungen mit LCL	6	2	1	12
insgesamt	33	8	9	85
%	24,4	5,9	6,7	63,0
Antiserum 7				
135 Untersuchungen mit PBL	26	4	4	80
21 Untersuchungen mit LCL	6	1	2	12
insgesamt	32	5	6	92
%	23,7	3,7	4,4	68,1
übereinstimmende Reaktionen	25	1	2	79
%	18,5	0,7	1,5	58,5
übereinstimmend positiv, unterschiedlich stark positiv	10 (7,4%)			
unterschiedliche Reaktionen	18 (13,3%)			

15 Testzellen (6,5%) unterscheiden sich in bezug auf die Reaktionsstärke. D.h. sie waren sowohl mit dem Antiserum 6 als auch mit dem Antiserum 7 im Test positiv, jedoch mit unterschiedlicher Stärke.

Die restlichen 23 Testzellen (10%) stellen die eigentlichen Unterschiede im Reaktionsmuster der Antiseren 6 und 7 dar. Diese Testzellen waren mit dem Antiserum 6 positiv und mit dem Antiserum 7 negativ (14 Fälle) oder umgekehrt (9 Fälle).

Die Signifikanz für eine Ähnlichkeit der beiden Antiseren kann wiederum aus den Werten der 2 x 2 Kontingenztafel mit dem X^2-Test ermittelt werden:

a = 63, b = 9, c = 14, d = 144;
X^2 = 137,3 und der Korrelationskoeffizient r beträgt 0,77.

DISKUSSION

1. Spezifität der in den Vorversuchen analysierten, heterologen Anti-HLA-Antiseren

Kriterien für die Qualität eines Anti-HLA-Antiserums sind seine Spezifität, der Titer und die Reaktionsstärke. Die Spezifität bezeichnet im weiteren Sinn das ganze Reaktionsprofil, also auch Kreuzreaktionen bzw. Extrareaktionen des Antiserums.

Wie bereits eingangs erwähnt, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, heterologe Antiseren herzustellen, die in ihrer Reaktivität "monospezifischen" Alloantiseren ähnlich sind.

1.1. Antiserum 1 und 2

Für die Analyse serologischer Untersuchungsergebnisse eignen sich mathematische (75) und rein deskriptive Methoden (76, 77).

Ergebnisse der statistischen Auswertung können durch eine graphische Darstellung der experimentellen Daten ergänzt bzw. bestätigt werden. Dies soll am Beispiel der Antiseren 1-3 aufgezeigt werden.

Die schematische Darstellung der Reaktionen von Antiserum 1 und 2 hinsichtlich der HLA-Eigenschaften B 15 und B W 35 (Abbildung 5 und 6) ist von LEPAGE (76) übernommen. Aus dem D/C Verhältnis für jede einzelne HLA-Eigenschaft kann auf die Spezifität des Antiserums geschlossen werden.

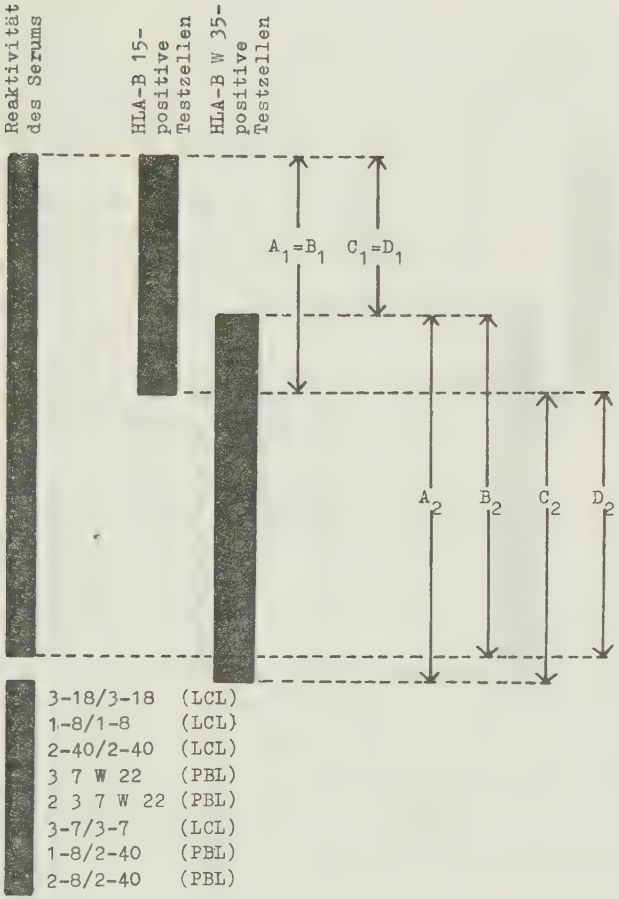


Abbildung 5 Reaktionsspektrum des Antiserums 1 (1 : 4)

A_1 : Anzahl der Testzellen mit Antigen HLA-B 15

B_1 : positive Testreaktionen mit HLA-B 15-positiven Testzellen

C_1 : Anzahl der HLA-B 15-, nicht jedoch gleichzeitig HLA-B W 35-positiven Testzellen

D_1 : positive Testreaktionen mit HLA-B 15-, nicht jedoch HLA-B W 35-positiven Testzellen

A_2-D_2 : entsprechende Angaben für HLA-B W 35-positive Testzellen

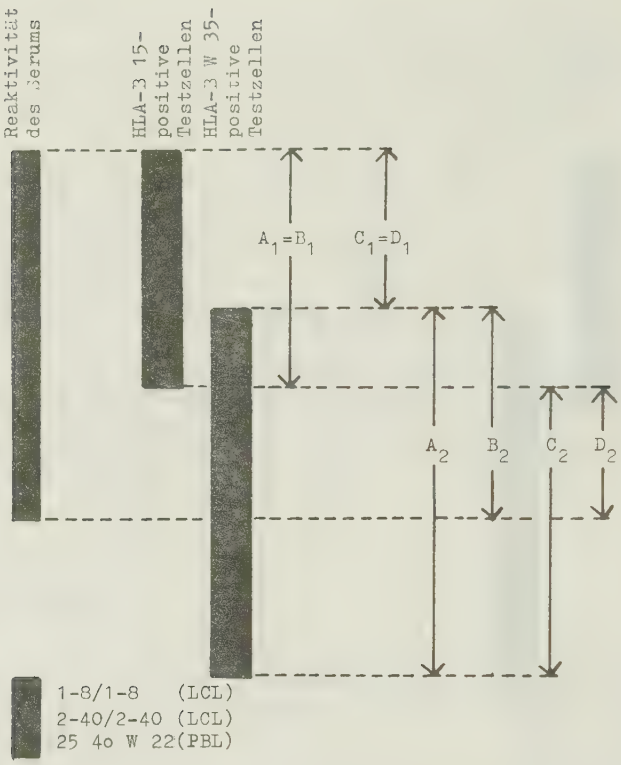


Abbildung 6 Reaktionsspektrum des Antiserums 2 (1 : 4)

A_1-D_1 und A_2-D_2 siehe Abbildung 5

Der D/C Wert für das Antigen HLA-B 15 beträgt bei beiden Antiseren 6/6. Das D/C Verhältnis für das Antigen B W 35 differiert jedoch bei beiden Antiseren. Für das Antiserum 1 ergibt sich der Wert D_2/C_2 = 10/11; für das Antiserum 2 der Wert D_2/C_2 = 5/11.

Auch die Reaktionen der Antiseren mit Zellen, die nicht die Eigenschaften HLA-B 15 oder B W 35 aufwiesen, unterscheiden sich quantitativ. Beide Antiseren reagierten zusätzlich mit Testzellen, die das Antigen B 40 exprimiert hatten.

Diese Ergebnisse können durch die statistische Auswertung des Untersuchungsmaterials bestätigt und ergänzt werden.

Die Reaktionen des Antiserums 1 mit HLA-B 15 bzw. B W 35-positiven Testzellen sind hoch signifikant ($p < 0{,}001$). Beim Antiserum 2 sind die Reaktionen mit dem Antigen HLA-B 15 signifikanter als die mit dem Antigen HLA-B W 35.

Was das Reaktionsmuster der beiden Antiseren mit dem Antigen HLA-B 40 betrifft, so kann festgestellt werden, daß die Reaktionen in beiden Fällen statistisch nicht signifikant sind. Auf Grund der Berechnung des Korrelationskoeffizienten und aus der Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit im FISHER-Test kann angenommen werden, daß die Antiseren 1 und 2 für keine weitere HLA-Eigenschaft spezifisch sind.

1.2. Antiserum 3

Die Spezifität des Antiserums 3 resultiert aus den statistischen Berechnungen des Zusammenhangs von HLA-Eigenschaften und Testreaktionen.

Maßzahlen für positive und negative Korrelationen sind die Korrelationskoeffizienten und die nach FISHER ermittelten Irrtumswahrscheinlichkeiten p_2.

Im statistischen Signifikanzbereich liegen die p_2-Werte für die Antigene HLA-B 12 und HLA-A 9 (Tabelle 13). Da die LCL-Zellen, die zur Immunisierung der Kaninchen verwendet wurden, nicht HLA-A 9 im HLA-Muster hatten, bedarf es einer Erklärung für die Kreuzreaktionen des Antiserums 3 mit HLA-A 9-positiven Testzellen.

Möglicherweise waren im Antiserum 3 in der Verdünnung 1:4 noch Antikörper mit der Spezifität für das Antigen HLA-A 2 vorhanden, die mit der Eigenschaft HLA-A 9 kreuzreagieren können (79). Diese Interpretation liegt nahe, da die zur Immunisation eingesetzten LCL-Zellen IFH-10 HLA-A 2-positiv waren. Der Korrelationskoeffizient für diese Eigenschaft r=0,07 ist statistisch nicht signifikant und widerliegt damit die Argumentation.

Auch aus Abbildung 7 geht hervor, daß Testzellen mit dem Antigen HLA-A 2 in den überwiegenden Fällen nicht durch das Antiserum 3 lysiert wurden.

Das D/C Verhältnis der Reaktionen mit Testzellen, die entweder HLA-B 12- oder HLA-A 9-positiv waren, beträgt 7/8 und 4/5. D.h., daß für Testzellen mit diesen HLA-Eigenschaften das Verhältnis von positiven zu negativen Testreaktionen gleich groß ist.

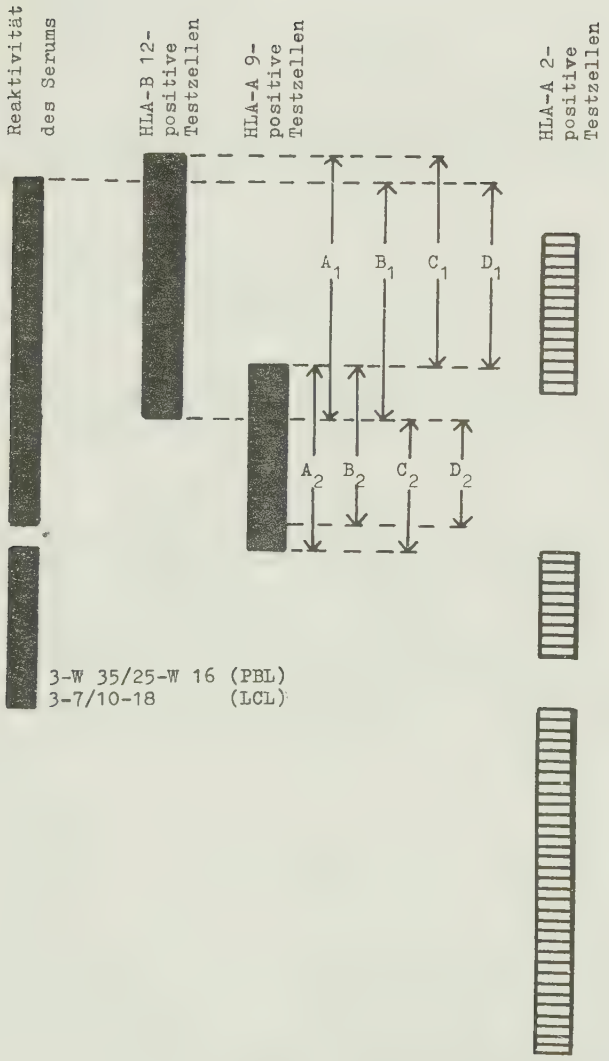


Abbildung 7 Reaktionsspektrum des Antiserums 3 (1 : 4)

A_1-D_1 und A_2-D_2 siehe Abbildung 5

Die schraffierten Flächen stehen für Testzellen mit der Eigenschaft HLA-A 2

Die Reaktionen des Antiserums 3 mit HLA-A 9-positiven Testzellen können als Kreuzreaktionen von supertypischen Antikörpern interpretiert werden.

Kreuzreaktionen der Anti-HLA-Antiseren mit Antigenen der HLA-A und -B-Serie sind bisher schlechter charakterisiert als die mit Antigenen innerhalb einer Serie (78).

Beispiele für supertypische Eigenschaften sind die Spezifitäten B W 4 und B W 6, die sich aus einer Reihe subtypischer Determinanten zusammensetzen (5, 14, 47, 48, 104, 105, 121).

Personen, die HLA-A 9 oder HLA-B 12 im HLA-Phänotyp aufweisen, können auch als HLA-B W 4-positiv typisiert werden (122).

LEGRAND et al. berichteten von einem allogenen Anti-HLA-Antiserum mit der komplexen Spezifität für die Eigenschaften HLA-A 9, -B 5, -12, -17, -W 21 und -27 (123). Reaktionen mit Testzellen, die diese Eigenschaften, ausgenommen die Antigene HLA-B 12 und HLA-A 9, hatten, waren jedoch nicht im Wirkungsspektrum des Antiserums 3 nachzuweisen.

2. Spezifität der heterologen Anti-HLA-B 12 Antiseren

Heterologe Antiseren mit der Spezifität für das Antigen HLA-B 12 stehen im Mittelpunkt der vorliegenden Untersuchungen. Die Diskussion über die Spezifität der Antiseren 6 und 7 soll daher mit einem kurzen Exkurs in die Literatur über die Eigenschaft HLA-B 12 beginnen.

2.1. Biographie der Eigenschaft HLA-B 12

Auf dem 4. Histokompatibilitäts-Workshop 1970 wurde die Spezifität "HL-A 12" festgelegt, die von verschiedenen Autoren u.a. durch folgende Antiseren bestimmt worden war (Tabelle 35, nach ALLEN et al. 1970; 80).

Tabelle 35

Antiseren mit der Spezifität für HLA-B 12

Nr.	Labor	Bezeichnung des Antiserums	Bezeichnung der Spezifität	mittlere Häufigkeit	% stark positive Reaktionen
93	Bashir	KR 2170	KN-T 12 (21)[1]	32	87
94	Bashir	MP 141	KN-T 12	26	73
95	Bashir	RH 793	KN-T 12	25	76
51	Payne-Bodmer	1096 Zerbe	To 11 (81)	15	59
159	Ceppellini	36.25	To 11	28	83
17	Dausset	Bil. 4182	Da 4 (82)	25	78
119	Joysey	Daines	Te 9 (83)	27	81
37	Kissmeyer-Nielsen	12714-69	KN-T 12	28	84
169	Terasaki	3532	Te 9	25	81
81	Zmijewski	C 111	Te 9	30	75

1) Referenzen

Weitere Anti-HL-A 12 Antiseren wurden von nachstehenden Arbeitsgruppen publiziert (nach W.H.O. Terminology Report 1972; 91).

äquivalent zu Spezifität HL-A 12	Arbeitsgruppe	Referenz
Ao 15	Amos	84
Bt 6	Batchelor	85
4a 11	Bodmer	86
CLB 14	Engelfriet	87
Sly 1	Morris	88
4a 11	Payne	89
TT	Thorsby	90

1968 wies KISSMEYER-NIELSEN darauf hin, daß die Spezifität "4a", die von van ROOD beschrieben worden war, zusammengesetzt ist aus den Faktoren HLA-5, 12 und 13+ (91). Außerdem postulierte er 1970, daß es eine der Spezifität HLA-12 sehr ähnliche Eigenschaft TT* gibt, die bei Afrikanern häufiger vorkommt als bei der europäischen Bevölkerung. Das W.H.O. Nomenklatur-Kommittee bezeichnete diese Eigenschaft als HLA-B W 45 (92). D.h. die Eigenschaft HLA-B 12 kann mit entsprechenden Antiseren differenziert werden in HLA-B W 44 (entspricht HLA-B 12, nicht TT*) und in HLA-B W 45 (entspricht dem TT*). Bei den europäischen Testpersonen entspricht demnach der Faktor HLA-B 12 in den meisten Fällen dem HLA-B W 44.

Bei den in Tabelle 35 aufgeführten Anti-HLA-B 12 Antiseren handelt es sich um Alloantiseren von Schwangeren oder von gezielt immunisierten Personen.

OH (93) hat die Immunogenität von HLA-Antigenen bei Primiparen untersucht und kam zu dem Ergebnis, daß HLA-B 12 in 2 von 19 inkompatiblen Mutter-Kind-Konstellationen Anti-HLA-B 12 Antikörper bei der Mutter hervorrief. Die stärksten Immunogene bei dieser Studie waren jedoch die HLA-Eigenschaften HLA-B 5 und -B 14.

Heterologe Anti-HLA-Antiseren mit Monospezifität für das Antigen HLA-B 12 wurden bisher noch nicht beschrieben. Allerdings berichteten EGURO (94) und CRESSWELL (64) von heterologen Anti-HLA-Antiseren, die mit dem Antigen HLA-B 12 kreuzreagierten.

Interessant für die vorliegende Untersuchung ist auch das Ergebnis eines heterologen Immunisierungsexperimentes, das die Arbeitsgruppe FERRONE et al. (66) veröffentlichte. Diese Gruppe immunisierte mit Antigen HLA-A 9, das aus dem Serum eines Blutspenders mit dem HLA-Muster HLA-A 9, -A 28, - B 12, -B W 15 gewonnen wurde. Das resultierende Antiserum reagierte in niederen Verdünnungsstufen mit allen Testzellen ohne Präferenz für ein bestimmtes HLA-Muster. In der Verdünnung 1:8 hingegen war das Antiserum monospezifisch für die Eigenschaft HLA-A W 24.

Am Beispiel der Antigene HLA-B 5 und -B 12 diskutiert AMOS drei Modelle, die Ähnlichkeiten der beiden Molekülstrukturen molekularbiologisch erklären:

- das Modell des zufälligen Basenaustauschs im Cistron, der Sequenzhomologien der Antigenmoleküle zur Folge hat ("random substitution");
- die Möglichkeit eines Basenaustauschs innerhalb des gesamten Cistrons mit Ausnahme eines hypovariablen Genabschnittes ("restricted substitution") und
- das Modell "allelic exclusion", demzufolge ein Suppressor die Übersetzung jeweils eines Cistrons reguliert (14).

Einen wichtigen Schritt zur Aufklärung von Kreuzreaktionen, die auf der Ähnlichkeit der antigenen Molekülstrukturen beruhen (124, 125), stellen chemische Sequenzanalysen der HLA-Präparationen dar.

TERHORST et al. (95) und HOOD et al. (96) berichten über Analysen von HLA-A 2 und -B 12 und -B 7-Antigenmischungen. Die Aminosäuregehalte unterscheiden sich demnach nur geringfügig:

HLA-A 2:

Gly Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Pro.

HLA-B 7, 12:

Gly Ser Met Val Tyr Phe Tyr Thr Ala Val Ser Arg Pro.
Arg

nach HOOD et al. 1976 (96).

Untersuchungen von Assoziationen des Antigens HLA-B 12 mit Genprodukten in und außerhalb des MHC können ebenfalls Kreuzreaktionen verständlich machen. Bekannt sind die gametischen Assoziationen von HLA-B 12 mit HLA-A 2 (126) und HLA-C W 5 (97). Die seltene Blutgruppe "Chido" ist offensichtlich eng korreliert mit HLA-B 12 (98).

Um herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen bestimmten Krankheiten und HLA-B 12 besteht, wurden Fälle von chronisch myeloischer und chronisch lymphatischer Leukämie sowie von Retinoblastoma untersucht (Übersicht, 99). Bisher konnte jedoch keine Korrelation mit HLA-B 12 nachgewiesen werden.

2.2. Antiserum 6

2.2.1. Spezifität des Antiserums 6

Für das Antiserum 6 sind ebenso wie für das Antiserum 3 die Reaktionen mit HLA-B 12-positiven Testzellen charakteristisch. Prüfgröße für die Spezifität des Antiserums 6 ist wiederum der Korrelationskoeffizient nach PEARSON,

der für die 2 x 2 - Kontingenztafel der Eigenschaft HLA-B 12 r=0,77 beträgt. Dieser Wert besagt, daß etwa 70% aller positiven Testreaktionen mit dem Antiserum 6 in der Verdünnung 1:8 auf PBL und LCL entfallen, die auch das Antigen HLA-B 12 im HLA-Muster hatten. Aus der statistischen Überprüfung der Untersuchungsergebnisse geht weiterhin hervor, daß das Antiserum 6 auch mit der Eigenschaft HLA-B 13 positiv korreliert ist. Beleg dafür ist die nach FISHER berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit p_2. Sie beträgt unter der Voraussetzung, daß HLA-B 12-positive Testzellen aus der Kontingenztafel ausgeschlossen bleiben, $p_2=2,2 \times 10^{-8}$. Der Anteil dieser Reaktionen am Reaktionsspektrum des Antiserums 6 in der Verdünnung 1:8 macht 15% aller positiven Reaktionen aus.

Kreuzreaktionen von Anti-HLA-B 12 Antiseren mit HLA-B 13-positiven Testzellen wurden auch in der Literatur beschrieben. EGURO (94) wies auf eine teilweise Absorption von Anti-HLA-B 12-Antiseren mit HLA-B 13-positiven Lymphozyten hin. Im Gegensatz zum Antiserum 6 konnten jedoch beim Antiserum 3 keine Kreuzreaktionen mit HLA-B 13-positiven Testzellen festgestellt werden. Die Kreuzreaktionen des Antiserums 3 mit der Eigenschaft HLA-A 9 konnten andererseits beim Antiserum 6 nicht im gleichen Umfang nachgewiesen werden. Ein Grund für die unterschiedlichen Kreuzreaktionen beider Antiseren kann in den HLA-Phänotypen der zur Absorption verwendeten LCL-Zellen liegen. Das Antiserum 3 wurde mit LCL-IFH-17 (HLA: 2-15/2-15) und Antiserum 6 mit LCL-IFH-18 (HLA: 3-W 35/2-15) absorbiert.

Die Untersuchung des Antiserums 6 im für B-Zellen modifizierten Mikrozytotoxizitätstest erbrachte keine Hinweise auf eine B-Zell-Spezifität des Antiserums 6.

2.2.2. Reaktionsstärke und Titer des Antiserums 6

Auf die Reaktionsstärke des Antiserums 6 wird in 2.4.2. Bezug genommen.
In der Verdünnung 1:8 des Antiserums 6 konnten HLA-B 12-positive Testzellen zu 95,8% als HLA-B 12-positiv identifiziert werden.
Bei der Titerstufe 1:16 hingegen betrug der Anteil dieser Fälle 90,2%.
Bei der Verwendung des Antiserums 6 zur HLA-Typisierung ist daher die Verdünnung 1:8 der Verdünnung 1:16 vorzuziehen.

2.3. Antiserum 7

2.3.1. Spezifität des Antiserums 7

Auch beim Antiserum 7 korrelieren die positiven Testreaktionen statistisch signifikant mit dem Antigen HLA-B 12. Der Korrelationskoeffizient r beträgt 0,807.
Dieser Wert ist der größte unter den berechneten Korrelationskoeffizienten. Alle anderen sind kleiner als 0,09 und damit Argumente gegen eine positive Korrelation.
Auch die p_2-Werte liegen mit Ausnahme der für die Eigenschaften HLA-A W 32 und A 29 ermittelten nicht im statistischen Signifikanzbereich (Tabelle 28). Die positiven Reaktionen des Antiserums 7 mit HLA-A W 32- oder HLA-A 29-positiven Testzellen sind jedoch auf Assoziationen mit HLA-B 12 im Phänotyp der untersuchten PBL und LCL zurückzuführen.
Diese Interpretation stützt sich auf die ähnlich wie in der Inklusionsmethode (100, 101) hergeleiteten Korrelationskoeffizienten und Wahrscheinlichkeitswerten nach FISHER.

Aus Tabelle 29 geht hervor, daß nach Eliminierung der HLA-B 12-positiven Testzellen aus den Untersuchungsdaten keine weiteren, statistisch signifikanten Korrelationen mehr nachzuweisen sind.

Die Qualität des Antiserums 7 und des Antiserums 6 ist gekennzeichnet durch den kleinen Prozentsatz unerwartet negativer Testergebnisse mit HLA-B 12-positiven Testzellen.

Im Test mit dem Antiserum 7 in der Verdünnung 1:8 wurden zwei HLA-B 12-positive Testzellen nicht lysiert (13866 und 13450, Tabelle 16). Interessant ist, daß diese beiden PBL durch das Antiserum 6 nicht hingegen durch das Antiserum 7 als HLA-B 12 typisiert werden konnten.

Umgekehrt konnten zwei der im Test mit Antiserum 6 nicht als HLA-B 12 identifizierbaren PBL (Nr. 11 und 14003, Tabelle 16) durch das Antiserum 7 als HLA-B 12-positiv klassifiziert werden. Die dritte "falsch" negative PBL der Untersuchung mit Antiserum 6 wurde nicht gleichzeitig mit Antiserum 7 getestet.

Möglicherweise handelt es sich bei den genannten vier Fällen um Testzellen mit wenig HLA-B 12 Antigenen auf der Zelloberfläche. Bekanntlich erfolgt die Zytolyse im Mikrozytotoxizitätstest in Abhängigkeit von der Konzentration der vorhandenen Antigene und Antikörper (102).

Entscheidend für die Qualität des Antiserums sind außerdem die "unerwartet positiven" Testresultate. Diese Reaktionen mit HLA-B 12-negativen Testzellen machen beim Antiserum 7 in der Verdünnung 1:8 23,4%.

Auf Grund der statistischen Überprüfung des Antiserums 7 auf Korrelationen mit HLA-Eigenschaften konnten die falsch positiven Reaktionen nicht eindeutig interpretiert werden. Antiserum 7 wurde daher auf eine mögliche B-Zell-Spezifität untersucht. Dem Ergebnis dieser Analyse zu Folge darf angenommen werden, daß Antiserum 7 Aktivität gegenüber HLA-D RW 7-positiven Testzellen aufweist. Der Wahrscheinlichkeitswert p_2 nach FISHER für diese Kontingenz beträgt $3{,}2 \times 10^{-6}$ und ist damit statistisch hoch signifikant. Diese MLC-Eigenschaft ist wahrscheinlich mit der Spezifität HLA-D RW 7 identisch (103). Die LCL zur Absorption des Antiserums 7 und des Antiserums 6 hingegen ist für die Eigenschaft HLA-DW 2 positiv.

Die Aktivität des Antiserums 7 gegenüber HLA-D RW 7-positiven Testzellen blieb also vorhanden, während die Aktivität gegenüber HLA-A 2-positiven Testzellen durch die Absorption nahezu vollständig eliminiert werden konnte.

2.3.2. Reaktionsstärke und Titer des Antiserums 7

Die Reaktionsstärke gibt an, wieviele der positiven Testresultate stark positive (vierfach positive) waren.
Die positiven Ergebnisse des Antiserums 7 in der Verdünnung 1:8 mit HLA-B 12-positiven Testzellen sind zu 72,8% vierfach positive Ergebnisse.

Alle falsch positiven Resultate zusammen genommen haben eine Reaktionsstärke von 27,7%. D.h., daß diese Resultate prozentual niedriger lagen als die mit HLA-B 12-positiven Testzellen.

Vergleichswerte für allogene Anti-HLA-B 12 Antiseren sind in Tabelle 35 zusammengestellt.

Der Titer ist ein weiterer Parameter für die Qualität eines Antiserums.

Antiserum 7 wurde in den Verdünnungen 1:8 bis 1:64 untersucht. Die Ergebnisse aus der Untersuchung des Antiserums 7 in der Verdünnung 1:8 stimmen am besten mit dem Ergebnis der HLA-Typisierung der Testzellen mit allogenen HLA-Antiseren überein. Die Verdünnung 1:16 hatte eine Herabsetzung der falsch positiven Ergebnisse zur Folge. Gleichzeitig erhöhte sich der Anteil der falsch negativen Resultate. Die Abweichungen betragen insgesamt 32,1%. Wie bereits erwähnt, sind die Verdünnungsstufen 1:32 und 1:64 nicht mehr relevant. Die Anzahl der falsch positiven Testzellen nimmt hier ab, während sich die Anzahl der falsch negativen Ergebnisse erhöht.

2.4. Vergleich Antiserum 6 und 7

Die Antiseren 6 und 7 sind zwei Beispiele für heterologe Anti-HLA-Antiseren mit Spezifität für das Antigen HLA-B 12. Bei der Herstellung wurden als Immunogene zwei unterschiedliche LCL-Zellen von nicht verwandten Blutspendern eingesetzt.

Die Gegenüberstellung der Untersuchungsergebnisse von Antiserum 6 und 7 ermöglicht daher, Aussagen über die Reproduzierbarkeit der hier beschriebenen Anti-HLA-Antiseren zu machen.

In Tabelle 36 sind die wichtigsten Resultate der Antiseren 6 und 7 in der Verdünnung 1:8 im Test mit PBL und LCL zusammengestellt. Diskutiert werden Spezifität, Kreuzreaktionen und Reaktionsstärke der Antiseren.

Tabelle 36 Überblick über die wichtigsten Untersuchungsergebnisse der Antiseren 6 und 7 in der Verdünnung 1 : 8

HLA-Antigen	Phänotyp-frequenz (%)		Häufigkeiten der 2x2 Kontingenztafeln a	b	c	d	Korrelations-größen	Anteil am Reaktions-spektrum (%)	Reaktions-stärke
Antiserum 6									
HLA-B 12	22,5	a)	68	3	27	214	$r = 0,77$	71,6	85,3
HLA-B 13	9,5	a)	17	13	78	204	$r = 0,18$	14,7	
		b)	14	13	13	201	$p_2 = 2,2 \times 10^{-8}$		28,6
HLA-A 1	36,4	a)	37	78	58	139	$r = 0,02$	(3,2)	
		c)	3	75	10	126	$p_2 = 0,46$		
HLA-A 2	48,4	a)	36	117	59	100	$r = - 0,14$	(4,2)	
		c)	4	104	9	97	$r = - 0,10$		
HLA-A 3	23,1	a)	9	64	86	153	$r = - 0,21$	3,2	
		c)	3	60	10	141	$p_2 = 0,86$		
HLA-A 9	16,4	a)	17	35	78	182	$r = 0,02$	(2,1)	
		c)	6	34	21	170	$p_2 = 1$		
HLA-A 29	4,1	a)	9	4	86	213	$p_2 = 0,007$	(1,1)	
		c)	2	32	11	169	$p_2 = 1$		
HLA-B 5	10,1	a)	9	23	86	194	$r = - 0,01$	(3,2)	
		c)	3	21	10	180	$p_2 = 1$		
Antiserum 7									
HLA-B 12	25,2	a)	59	2	18	159	$r = 0,807$	76,6	72,9
HLA-B 13	9,5	a)	7	16	70	145	$r = - 0,01$	3,9	33
		b)	3	16	15	143	$p_2 = 1$		

Fortsetzung umseitig

Antiserum 7

HLA-Antigen	Phänotyp-frequenz (%)		Häufigkeiten der 2x2 Kontingenztafeln a	b	c	d	Korrelations-größen	Anteil am Reaktions-spektrum (%)	Reaktions-stärke
HLA-A 1	31,4	a)	25	51	52	110	$r = 7,9 \times 10^{-3}$		
		b)	4	50	14	109	$r = - 0,06$		
HLA-A 2	51,2	a)	31	93	46	68	$r = - 0,16$		
		b)	4	93	14	66	$r = - 0,22$		
HLA-A 3	23,9	a)	12	46	65	115	$r = - 0,14$		
		b)	7	46	11	113	$r = 0,06$		
HLA-A 9	17,7	a)	18	25	59	136	$r = 0,09$		
		b)	4	25	14	134	$p_2 = 1$		
HLA-A 29	3,3	a)	7	1	70	160	$p_2 = 3,6 \times 10^{-3}$	1,3	
		b)	1	1	17	158	$p_2 = 0,38$		
HLA-B 5	9,1	a)	6	16	71	145	$r = - 0,03$		
		b)	2	15	16	144	$p_2 = 1$		

Erläuterungen

a) die Untersuchung schließt HLA-B 12-positive Testzellen ein
b) eliminiert sind HLA-B 12-positive Testzellen
c) eliminiert sind HLA-B 12- und HLA-B 13-positive Testzellen

2.4.1. Spezifität der Antiseren 6 und 7

Beide Antiseren, 6 und 7, sind für die Eigenschaft HLA-B 12 spezifisch. Die Anzahl der Testzellen, die demnach als falsch negativ oder als falsch positiv eingestuft werden müssen, ist beim Test mit dem Antiserum 6 größer als mit dem Antiserum 7. Die für das Antigen HLA-B 12 spezifischen Reaktionen machen im Reaktionsspektrum des Antiserums 6 71,6% aller positiven Testergebnisse aus, beim Antiserum 7 beträgt dieser Anteil 76,6%.

Als Erklärung für die Extrareaktionen des Antiserums 7 wurden bereits die Kreuzreaktionen der Antikörper mit der für B-Lymphozyten charakteristischen Eigenschaft HLA-DRW 7 dargelegt.

Im Fall des Antiserums 6 liegt den Ergebnissen zufolge keine Spezifität für HLA DRW-Determinanten vor. Vielmehr treffen hier die abweichend positiven Ergebnisse, hauptsächlich mit HLA-B 13-positiven Testzellen, zusammen. Diese Reaktionen sind jedoch schwächer als die mit HLA-B 12-positiven Testzellen. Die Reaktionsstärke beträgt 28,6%.

Dieser Unterschied in der Spezifität der Antiseren 6 und 7 kann auf das HLA-Muster der LCL-Zellen zurückgeführt werden, die zur Immunisierung eingesetzt wurden. Im Fall vom Antiserum 6 wurden die Kaninchen mit LCL-Zellen immunisiert, die für die MLC-Eigenschaft HLA-DW 2 homozygot waren. Zur Herstellung des Antiserums wurden LCL-Zellen verwendet, die HLA-DW 7-positiv waren.

In Tabelle 36 sind die Korrelationen der Antiseren 6 und 7 zu den HLA-Eigenschaften A 1, A 2, A 3, A 9, A 29 und B 5 dokumentiert.

Der Anteil dieser Reaktionen am Reaktionssprektrum läßt sich beim Antiserum 6 für das Antigen A 3 noch uneingeschränkt angeben. Alle anderen Antigene waren im Haplotyp der falsch positiven Testzellen untereinander assoziert. So sind die in Klammer stehenden prozentualen Anteile am Reaktionsspektrum absolute Werte.

Vielfach werden Extrareaktionen von heterologen Antiseren Reaktionen mit spezies-spezifischen Antigenen zugeschrieben. Bei den vorliegenden Kreuzreaktionen handelt es sich sehr wahrscheinlich nicht um solche Aktivitäten.
Dafür spricht, daß 77% (Antiserum 7) bzw. 85% (Antiserum 6) der positiven Testergebnisse auf Testzellen mit der Eigenschaft HLA-B 12 (Antiserum 7) bzw. -B 12 und HLA-B 13 (Antiserum 6) entfielen. Diese Verteilung hätte sich nicht ergeben, wenn in beiden Antiseren vorwiegend spezies-spezifische Antikörper vorhanden gewesen wären.
Nicht auszuschließen, jedoch recht unwahrscheinlich ist es, daß die falsch positiven Reaktionen der beiden Antiseren - ausgenommen die Reaktionen mit HLA-B 13-positiven Testzellen - auf spezies-spezifische Antikörper in den Antiseren zurückzuführen sind.
Da sich unter den falsch positiven Testzellen auch LCL befinden, erhebt sich die Frage, ob möglicherweise die lymphoblastoiden Zellen leichter als die PBL durch die Antiseren lysiert wurden. Aus Tabelle 18 und Tabelle 26 ist jedoch zu ersehen, daß die Reaktionen mit LCL-Zellen das Reaktionsspektrum der Antiseren nicht wesentlich beeinflußten.

2.4.2. Reaktionsstärke der Antiseren 6 und 7

Die vierfach positiven Resultate unter den positiven Ergebnissen mit HLA-B 12-positiven Testzellen machen beim Antiserum 6 85,3% und beim Antiserum 7 72,9% aus. Das besagt, daß Antiserum 6 zwar bezüglich der Reaktionsstärke besser ist als das Antiserum 7. Dieses wiederum zeichnet sich gegenüber Antiserum 6 durch den höheren Anteil der positiven Ergebnisse für HLA-B 12-positive Testzellen aus.
Die Reaktionen der falsch positiven Testzellen sind insgesamt schwächer als die der Testzellen mit dem Antigen HLA-B 12.

2.4.3. Korrelation zwischen Antiserum 6 und 7

Wie im Ergebnisteil bereits ausgeführt, kann die Assoziation der beiden Antiseren untereinander wiederum mit Hilfe des Chi-Quadrattestes ermittelt werden.
Der Korrelationskoeffizient r=0,77 für diese Beziehung ist Ausdruck für eine gute Übereinstimmung der Untersuchungsergebnisse im Bereich der vergleichbaren Testergebnisse.

3. Möglichkeiten bei der Herstellung von heterologen Anti-HLA-Antiseren

Als Alternative und als Ergänzung zu den allogenen wurden von einigen Arbeitsgruppen heterologe Anti-HLA-Antiseren hergestellt (54, 57, 58, 61, 63, 64, 65, 66, 68). Die Antiseren waren jedoch zum Teil - ähnlich wie die Alloantiseren - oligo- oder multispezifisch.

Kreuzreaktionen mit allelen HLA-Genprodukten, die nicht als Immunogene verwendet worden waren, erschwerten die HLA-Typisierung mit diesen Antiseren.

Unspezifische Reaktionen von heterologen Antiseren schrieb man auch den sog. spezies-spezifischen Antikörpern zu, die bei der heterologen Immunisierung entstehen können (61, 106). Nur wenige xenogene Anti-HLA-Antiseren hatten bisher ein für HLA-A oder HLA-B-Genprodukte spezifisches Wirkungsspektrum.

Inzwischen mehren sich die Veröffentlichungen über heterologe Antiseren mit der Spezifität für sog. Ia-Eigenschaften (107, 108 , 109), die wahrscheinlich Genprodukte des HLA-Systems bzw. des MHC sind (110, 111). Allerdings gibt es Hinweise dafür, daß sich diese Antigene im Molekülaufbau von den HLA-A, -B, -C-Eigenschaften unterscheiden (112, 113 , 114 , 115).

In diesem letzten Abschnitt sollen prinzipielle Möglichkeiten bei der Herstellung von heterologen Anti-HLA-A, -B oder -C-Antiseren aufgezeigt werden.

3.1. Immunisierung der Kaninchen mit LCL-Zellen

Mit EBV transformierte periphere Blutlymphozyten, die über lange Zeit in vitro kultiviert werden können, haben gegenüber peripheren Blutlymphozyten oder Lymphozyten aus der Milz folgende Vorteile:
Wie in Absorptionsversuchen nachgewiesen werden konnte, exprimieren die lymphoblastoiden Lymphozyten die 20-50 fache Menge an HLA-A und -B Antigenen auf der Zelloberfläche (116). Möglicherweise ist dies auf die Integration des EBV in den Lymphozyten zurückzuführen.
Diskutiert wird, daß das EBV bestimmte Zellklone selektiert, die von vornherein mehr Antigene auf ihrer Zellmembran ausgeprägt haben (117).
Lymphoblastoide Zellen behalten meist bei Kultivierung über einen längeren Zeitraum hinweg die Fähigkeit, die ursprünglichen HLA-Eigenschaften zu synthetisieren (118).
Die Verwendung von lymphoblastoiden Kulturzellen ermöglicht es, mehrfache und wiederholte Immunisierung durchzuführen.

3.2. Immunisierung mit LCL-Zellen

Die Immunisierung der Kaninchen mit LCL-Zellen wurde aus folgenden Erwägungen heraus durchgeführt:
Mit Hilfe physikalisch-chemischer Methoden konnten bisher die allelen HLA-Genprodukte nur schwer voneinander getrennt werden (119). HLA-Antigene, die enzymatisch oder mit Detergentien aus der Zellmembran isoliert werden und zusätzlich über Filtrationsstufen rein dargestellt werden können, waren meist Gemische aus HLA-A und -B Genprodukten (64).

Die im Serum und Urin als freie Moleküle vorkommenden HLA-Antigene wurden daher als Immunogene bevorzugt (66). Bisher liegt allerdings keine Untersuchung darüber vor, ob tatsächlich alle allelen HLA-Eigenschaften im Serum oder im Urin vorkommen können.

Die HLA-Spaltprodukte, die man nach der Behandlung der Membranfraktionen mit Papain oder Detergentien erhalten kann, unterscheiden sich in der Anzahl der reproduzierbaren SH-Gruppen und im Molekulargewicht (117). Es stellt sich auch die Frage, ob nach den Manipulationen bei der Isolierung und Reindarstellung der HLA-Antigene ihre Immunogenität noch erhalten ist (117).

Da sich die allelen HLA-Genprodukte in der Zusammensetzung ihrer Aminosäuren nur minimal unterscheiden, liegt es nahe anzunehmen, daß die Architektur der HLA-Moleküle auf der Zelloberfläche die Immunogenität mitbestimmt.
Zwar konnte nachgewiesen werden, daß HLA-Antigene auf der Zelloberfläche nicht kovalent gebunden sind.
Damit ist jedoch nicht auszuschließen, daß nicht-kovalente Bindungen, die HLA-Moleküle zu Dimeren oder Oligomeren gruppieren (117).
Da die HLA-Antigene Transmembranmoleküle sind, kann möglicherweise ihre biologische Funktionsfähigkeit, d.h. auch ihre Immunogenität, nur im Verband mit der Zellmembran vollständig ausgeprägt sein.

3.3. Absorption der heterologen Antiseren mit LCL-Zellen

Die Absorption der heterologen Anti-HLA-Antiseren mit LCL-Zellen gibt die Möglichkeit, eventuell vorhandene spezies-spezifische Antikörper im Antiserum (120) zu binden und zu eliminieren (57).

Beweise dafür sind die Beispiele der Antiseren 4 und 5 in der vorliegenden Untersuchung. Beide Antiseren zeigten nach Absorption mit LCL-Zellen, die HLA-identisch waren mit den LCL-Zellen, die zur Immunisierung verwendet wurden, keine Aktivität mehr gegenüber Testzellen.

ZUSAMMENFASSUNG

Für die serologische Typisierung der polymorphen HLA-Antigene stehen vorwiegend Alloantiseren von Schwangeren oder freiwillig Immunisierten zur Verfügung. Als Alternative und Ergänzung dafür wird von verschiedenen Arbeitsgruppen die Herstellung heterologer Anti-HLA-Antiseren vorgeschlagen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Herstellung heterologer Anti-HLA-Antiseren dokumentiert, die durch Immunisierung und Absorption mit LCL-Zellen definierter HLA-Muster gewonnen wurden.

LCL-Zellen wurden gewählt, weil sie ihr Antigenmuster über einen relativ langen Zeitraum der Kultivierung beibehalten und daher wiederholt verwendet werden können. Der Herstellungsvorgang und z.T. auch die Austestung der Antiseren ist so weitgehend unabhängig von der Verfügbarkeit geeigneter Zellspender.

Die Absorption der Antiseren mit LCL-Zellen wurde durchgeführt, um kreuzreagierende Antikörper zu eliminieren. Zu dieser Gruppe von Antikörpern gehören u.a. die sog. spezies-spezifischen Antikörper, die im serologischen Nachweis die Aktivität HLA-spezifischer Antikörper verdecken können.

Das Konzept der vorliegenden Arbeit besteht in der
- Immunisierung von Kaninchen mit EBV-infizierten LCL-Zellen,
- Absorption der Antiseren mit LCL-Zellen, die im HLA-Phänotyp zum Immunogen differierten,
- Reinigung der absorbierten Antiseren über einen DEAE-Zellulosegradienten,
- Austestung der absorbierten Antiseren im Mikrozytotoxizitätstest gegen HLA-typisierte PBL und LCL

und der statistischen Auswertung der Untersuchungsergebnisse mit Hilfe des Chi-Quadrat - und des FISHER-Exakt - Testes.

Die vorliegenden Experimente an heterologen Anti-HLA-Antiseren wurden in Vor- und Hauptversuche unterteilt.

In Vorversuchen wurden zwei Antiseren getestet, die nach Immunisierung mit HLA-B 15 positiven LCL-Zellen produziert wurden (Antiserum 1 und 2). In einem weiteren Versuchsansatz wurde ein Antiserum durch Immunisierung mit HLA-B 12-positiven LCL-Zellen hergestellt (Antiserum 3). Die Absorption der Antiseren 1-3 erfolgte mit LCL-Zellen, die im HLA-Phänotyp nur eine Eigenschaft mit dem Immunogen gemeinsam hatten.

Aus der Analyse der absorbierten Antiseren ging hervor, daß diese Antiseren Antikörper mit Spezifität für die als Immunogen eingesetzten HLA-Antigene auf den LCL-Zellen hatten. Allerdings wiesen diese Antiseren auch Kreuzreaktionen mit allelen HLA-Antigenen auf, die nicht zur Immunisierung verwendet wurden. So reagierten die Antiseren 1 und 2 mit HLA-B W 35 positiven Testzellen im Mikrozytotoxizitätstest. Das Antiserum 3 lysierte neben HLA-B 12 positiven- auch HLA-A 9 positive Testzellen.

Am Beispiel der Antiseren 4 und 5 wurde dargelegt, daß nach Absorption mit LCL-Zellen, die im HLA-Phänotyp mit dem Immunogen übereinstimmten, keine Aktivität der Antiseren gegenüber Testzellen im Mikrozytotoxizitätstest mehr vorhanden war.

Das Antiserum 4 wurde durch Immunisierung mit der LCL-IFH-16 (29-12/2-12) hergestellt. Die LCL zur Absorption, LCL-IFH-10 (2-12/2-12), war in den HLA-A- und B-Eigenschaften mit LCL-IFH-16 nahezu identisch. Beide LCL wurden jedoch von PBL unverwandter Blutspender angelegt.

Das Antiserum 5 wurde durch eine Kombination von LCL-Zellen zur Immunisierung und zur Absorption hergestellt, die von HLA-identischen Geschwistern etabliert worden waren.

In den Verdünnungen 1:4 bis 1:64 waren beide Antiseren im Mikrozytotoxizitätstest negativ gegenüber Testzellen (Antiserum 4 = 16 Untersuchungen und Antiserum 5 = 24 Untersuchungen an PBL und LCL).

Schwerpunkt der Arbeit bilden die Versuchsserien zur Analyse des Antiserums 6 und 7. Als Immunogene wurden in beiden Fällen HLA-B 12-homozygote LCL-Zellen verwendet, die von unverwandten Blutspendern angelegt worden waren. Unterschiede im HLA-Phänotyp waren : HLA-A 2/A 29 und DW 2/DW 7. Die LCL-Zellen zur Absorption hingegen waren in beiden Fällen identisch (HLA: 3-W 35/2-15).

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse (Antiserum 6: 312 Untersuchungen, Antiserum 7: 238 Untersuchungen) ließ erkennen, daß beide Antiseren in der Verdünnung 1:8 für das Antigen HLA-B 12 hoch spezifisch sind.

Die Korrelationskoeffizienten r sind für das Antiserum 6 : $r = 0{,}77$ und für das Antiserum 7 : $r = 0{,}807$.

Der Anteil der "falsch negativen" Ergebnisse lag bei beiden Antiseren unter 5% bezogen auf HLA-B 12 positive Testzellen.

Die "falsch positiven" Ergebnisse hatten beim Antiserum 6 28,4%, beim Antiserum 7 23,4% Anteil am Reaktionsspektrum. Während diese Reaktionen beim Antiserum 6 weitgehend Kreuzreaktionen mit HLA-B 13 positiven Testzellen zugeschrieben werden konnten, brachte beim Antiserum 7 erst eine Untersuchung auf Spezifität für B-Zelleigenschaften eine mögliche Interpretation für die "abweichend positiven" Resultate.

Zur Analyse der Antiseren auf eine mögliche Korrelation zwischen B-Zelleigenschaften (DRW-Antigene) und der Spezifität der Antikörper wurden die Antiseren 6 und 7 mit gepoolten Thrombozyten absorbiert. Die so absorbierten Antiseren wurden im modifizierten Mikrozytotoxizitätstest gegen PBL untersucht, die in den B-Lymphozyten angereichert waren. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen führten zu dem Schluß, daß Antiserum 6 über keine Aktivität gegenüber DRW-Eigenschaften verfügt. Das Antiserum 7 hingegen hatte eine statistisch signifikante Korrelation zu DRW 7-positiven Testzellen. Beim Vergleich aller Testergebnisse von Antiserum 6 und 7 stellte sich heraus, daß diese weitgehend übereinstimmten.

Die Resultate der vorliegenden Untersuchung zur Herstellung heterologer Anti-HLA-Antiseren zeigen, daß die Verwendung von lymphoblastoiden Zellinien für die Immunisierung und Absorption zu heterologen Antiseren mit deutlicher Spezifität für HLA-Eigenschaften führt.

Spezifische heterologe Anti-HLA-Antiseren werden künftig möglicherweise die konventionellen Alloantiseren ersetzen können.

ANHANG

Tabelle 16

Ergebnisse des Mikrozytotoxizitätstestes der Antiseren 6 und 7 mit LCL und PBL

1. LCL als Testzellen, untersucht mit den Antiseren 6 und 7 in den Verdünnungsstufen 1:8 - 1:64

LCL-IFH-	HLA - Phänotyp	Antiserum 6 1:				Antiserum 7 1:			
		8	16	32	64	8	16	32	64
1	2-8-W 35	-	-	-	-	-	-	-	-
2	3-7/3-7	-	-	-	-	-	-	-	-
3	2-3-7-40	-	-	-	-	-	-	-	-
4	1-8/1-8	-	-	-	-	.	.	.	.
5	2-12/2-12	+	+	+	-	+	+	+	+
6	1-8/1-8	-	-	-	-	+	-	-	-
7	3-18/3-18	-	-	-	-	-	-	-	-
8	10-W 16/3-W 21	+	+	-	-	+	+	+	-
10	2-12/2-12	+	+	+	+	+	+	+	+
13	2-40/2-40	+	+	-	-	+	+	-	-
14	3-W 35/2-15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	29-12/2-12	+	+	+	+	+	+	+	+
17	2-15/2-15	-	-	-	-	-	+	-	-
18	3-W 35/2-15	-	-	-	-	-	-	-	-
19	3-7/10-18	+	+	+	-	+	+	+	-
20	3-W 35/3-W 35	+	+	-	-	-	-	-	-
21	2-17/2-17	-	-	-	-	-	-	-	-
22	25-12/1-8	+	+	+	+	+	+	+	+
23	25-12/1-8	+	+	+	-	+	+	+	+
25	11-W 35/2-18	-	-	-	-	-	-	-	-
27	9-W 35/11-W 35	-	-	-	-	-	-	-	-
28	9-W 35/11-W 35	-	-	-	-	-	-	-	-

2. PBL als Testzellen, untersucht mit den Antiseren 6 und 7 in den Verdünnungsstufen 1:8 - 1:64

PBL Nr.	HLA - Phänotyp					Antiserum 6 1:				Antiserum 7 1:			
						8	16	32	64	8	16	32	64
1	2	W 19	12		13	+	+	+	+	+	+	+	+
2	3	9	7		7	-	-	-	-	-	-	-	-
3	2	3	12	W	16	.	.	.	.	+	+	+	+
4	1	W 19	8		5	-	-	-	-	-	-	-	-
5	2	9	12		17	.	.	.	.	+	+	+	+
6	3	25	W 35	W	16	-	-	-	-	+	+	-	-
7	2		15		27	-	-	-	-	+	-	-	-
8	1	2	8		7	.	.	.	.	-	-	-	-
9	3	11	7	W	35	-	-	-	-	-	-	-	-
10	28		7		14	-	-	-	-	-	-	-	-
11	9	10	7		12	-	-	-	-	+	+	+	+
12	9		12		15	.	.	.	.	+	+	+	+
13	2	3	7		15	-	-	-	-	-	-	-	-
14	1	11	W 35			-	-	-	-	-	-	-	-
15	16		W 16		12	.	.	.	.	+	+	+	+
16	25		40	W	22	.	.	.	.	-	-	-	-
17	2	9	15	W	16	.	.	.	.	-	-	-	-
18	2	28	7		14	-	-	-	-	-	-	-	-
19	3	2	5			-	-	-	-	-	-	-	-
20	2	11	W 35		15	.	.	.	.	-	-	-	-
21	1	10	8	W	22	-	-	-	-	-	-	-	-
22	29	W 32	27	W	35	+	+	+	-	+	+	-	-
23	3	2	7		5	-	-	-	-	-	-	-	-
24	2	1	7			-	-	-	-	-	-	-	-
25	2	3	7		40	-	-	-	-	-	-	-	-
26	1	9	8	W	35	-	-	-	-	-	-	-	-
27	2		W 35		40	-	-	-	-	-	-	-	-
28	1	9	15	W	21	+	+	+	-	+	-	-	-
29	2	9	12		13	+	+	+	+	+	+	+	+
30	3		7	W	22	-	-	-	-	-	-	-	-
31	2		8		40	-	-	-	-	-	-	-	-
32	1		7		8	-	-	-	-	-	-	-	-
33	1	2	8		13	-	-	-	-	-	-	-	-
34	1	2	8		40	-	-	-	-	-	-	-	-
35	2	28	12		14	+	+	+	+	+	+	+	-
36	9	26	7	W	16	+	+	+	-	-	-	-	-
13443	29	W 33	12		17	+	+	-	-	+	-	-	-
13444	1	29	8		12	+	+	-	-	+	+	-	-
13445	2	28	12		13	+	+	-	-	+	+	-	-
13446	1		8			-	-	-	-	-	-	-	-
13448	1	2	8		12	+	.	+	-	+	+	-	-
13449	1	28	8		13	-	-	-	-	-	-	-	-
13450		26	12		5	+	+	-	-	-	-	-	-

PBL Nr.	HLA - Phänotyp				Antiserum 6 1:				Antiserum 7 1:			
					8	16	32	64	8	16	32	64
13451	2		5	12	+	+	-	-	+	.	-	-
13452	2	26	5	12	+	+	-	-	+	-	-	-
13453	2	26	5	12	+	+	+	+	+	+	+	-
13454	2	9	7	13	-	-	-	-	-	-	-	-
13455	2	3	13	15	-	-	-	-	-	-	-	-
13456	2	3	13	15	+	-	-	-	-	-	-	-
13460	2	3	12	40	+	+	-	-	+	-	-	-
13461	1		40	8	-	-	-	-	-	-	-	-
13462	1		W 21	40	-	-	-	-	-	-	-	-
13463	1	W 33	13	W 21	+	-	-	-	-	-	-	-
13464	2		17	40	-	-	-	-	-	-	-	-
13486	9	29	12	W 21	+	+	+	+	+	+	+	+
13487	9		5	12	+	+	.	+	+	+	+	-
13488	9	29	7	12	+	+	-	-	+	+	-	-
13469	3	9	8	W 35	-	-	-	-	-	-	-	.
13470	2	9	12	15	+	+	-	-	+	+	-	-
13471	3	9	8	12	+	+	+	+	+	+	+	-
13472	1	3	7	8	-	-	-	-	-	-	-	-
13473	9		8	W 22	-	-	-	-	-	-	-	-
13474	3	9	7	8	-	-	-	-	+	-	-	-
13475	3	9	8	7	-	-	-	-	-	-	-	-
13476	9		12	W 16	+	+	-	-	+	+	+	-
13477	1	11	8	W 35	-	-	-	-	-	-	-	-
13478	1	9	8	12	+	+	+	+	+	+	+	-
13479	1	9	8	12	+	+	+	+	+	+	-	-
13480	1	W 32	12		+	+	-	-	+	+	-	-
13481	1		8	14	-	-	-	-	-	-	-	-
13482	1	W 32	8	12	+	+	+	+	+	+	+	-
13483	1	W 32	8	12	+	+	+	+	+	+	+	-
13484	1	W 32	8	12	+	-	-	-	+	-	-	-
13485	1	W 32	8	12	+	+	+	-	+	+	+	-
13492	2	3	W 22	W 35	-	-	-	-	-	-	-	-
13494	3	9	7	18	-	-	-	-	+	+	-	-
13495	3	9	7	27	-	-	-	-	-	-	-	-
13496	2		12	40	+	+	+	-	+	+	-	-
13497		26	5		+	-	-	-	+	-	-	-
13498	2	W 32	17	W 21	+	+	.	-	-	-	-	-
13499	2	W 30	12	W 35	+	+	+	+	+	+	+	-
13501	3	28	15	W 35	-	-	-	-	+	-	-	-
13514	9	10	12	18	+	+	+	+	+	+	+	-
13519	1	2	15	18	-	-	-	-	-	-	-	-
13520	10	28	12	40	+	-	-	-	+	+	-	-
13521	2	10	7	40	-	-	-	-	-	-	-	-
13522	2	10	8	40	-	-	-	-	-	-	-	-
13524	1	28	8	12	+	+	-	-	+	-	-	-
13526	2		14	W 35	-	-	-	-	-	-	-	-
13527	1	W 30	8	13	+	+	-	-	+	+	-	-

PBL Nr.	HLA - Phänotyp				Antiserum 6 1:				Antiserum 7 1:			
					8	16	32	64	8	16	32	64
13528	2		5	27	+	+	-	-	+	-	-	-
13529	2	W 33	5	13	-	-	-	-	-	-	-	-
13530	2	3	13	15	-	-	-	-	-	-	-	-
13531	2		5	13	-	-	-	-	-	-	-	-
13532	2	2	5	13	+	-	-	-	-	-	-	-
13533	2	9	W 38	27	-	-	-	-	-	-	-	-
13534	3	9	7	W 35	-	-	-	-	-	-	-	-
13535	3	9	27	W 35	-	-	-	-	-	-	-	-
13536	2	9	7	W 16	-	-	-	-	-	-	-	-
13537	9	W 30	13	13	+	+	-	-	-	-	-	-
13538	1	28	8	27	-	-	-	-	-	-	-	-
13539	9	28	13	27	+	+	-	-	+	-	-	-
13540	28	W 30	13	27	+	+	-	-	-	+	-	-
13541	28	W 30	13	27	+	+	-	-	+	-	-	-
13542	2	3	18	17	-	-	-	-	-	-	-	-
13553	3	W 32	12	37	+	+	-	-	+	+	-	-
13554	1		8	15	-	-	-	-	-	-	-	-
13555	1	3	8	37	-	-	-	-	+	-	-	-
13556	1	W 32	8	12	+	+	-	-	+	+	-	-
13557	1	11	27	W 35	-	-	-	-	-	-	-	-
13558	1		7	12	+	-	-	-	+	+	-	-
13559	1		12	27	+	+	-	-	+	+	-	-
13560	1	1	7	27	-	-	-	-	-	-	-	-
13561	1	1	12	27	+	+	+	-	+	+	-	-
13562	1	1	12	27	+	+	-	-	+	+	-	-
13564	9	11	W 35	40	-	-	-	-	-	-	-	-
13566	1	2	8	40	-	-	-	-	-	-	-	-
13567	2	3	15	W 35	-	-	-	.	-	-	-	-
13570	3	9	7	W 35	-	-	-	-	-	-	-	-
13580	1	2	7	8	-	-	-	-	-	-	-	-
13581	2		13	40	-	-	-	-	-	-	-	-
13584	2	26	7	18	-	-	-	-	-	-	-	-
13587	1	W 30	13	37	+	-	-	-	-	-	-	-

3. PBL als Testzellen, untersucht mit den Antiseren 6 und 7 in der Verdünnung 1:8

PBL Nr.	HLA - Phänotyp				Antiserum 6 1:8	Antiserum 7 1:8
13786	1	10	8	18	-	-
13787	1	2	8	12	+	+
13800	2	3	5	7	-	-
13801	1	11	5		-	-
13803	1	2	7	8	-	-
13804	2		8	W 35	-	-
13805	2		8	W 35	-	-
13806	1	2		8	-	-
13814	2	9	5	W 16	-	-
13816	1		7	8	-	-
13817	2		15	40	-	-
13818	2	29	7	40	-	-
13819	1	3	7	8	-	-
13820	1	3	7	8	-	-
13821		3	7		-	-
13822	1	26	5	27	-	-
13823	3		7	W 35	-	-
13824	26	28	7	40	-	-
13832	2	3	14	W 21	-	-
13834	1	W 30	8	13	+	-
13836	3		14	17	-	-
13837	2	3	14		-	-
13843	1		8		-	-
13845	2	W 30	13	27	-	-
13846	2		8	27	+	-
13847	2	W 30	8	13	-	-
13848	1	11	5		-	-
13850	1	9	5		-	-
13862	3	9	15		-	-
13865	1		15	W 35	-	-
13866	1		12	14	+	-
13867	1		17		+	-
13868	2	W 24	W 35		-	-
13881	2	9	12	W 35	+	+
13869	2		12	W 16	+	+
13887	2	26	5	40	-	-
13890	1	3	7	8	-	-
13889	1	2	W 38	37	-	-
13905	2	26	7	8	-	-
13906	1		8	14	-	-
13913	2	26	7	15	-	-
13914	2	3	7	W 35	-	-
13915	1	2	40		-	-
13916	1	2	7		-	-

PBL Nr.	HLA - Phänotyp						Antiserum 6 1:8	Antiserum 7 1:8
13917	1		2		7		-	-
13918	W 24		26		12	W 38	+	+
13924	2				40	37	-	-
13928	2		25		12		+	+
13929	2	W 30			12	W 21	+	+
13936	1		2		8	40	-	-
13934	3				7	W 35	-	-
13935	2		3		7	15	-	-
13937	28	W 24			12		+	+
13938	1		2	W 35		W 16	-	-
13940	1		11		7	8	-	-
13941	1				7	8	-	-
13943	2	W 24			15	W 39	-	-
13944	2	W 24			8	W 39	-	-
13945	2	W 24		W 39		40	-	-
13946	2	W 24			12	40	+	+
13947	3		11				-	-
13949	25	W 32			5	18	-	-
13964	9	W 32			7	14	-	-
13965	2				12	15	+	+
13966	2	W 32			7	12	+	+
13968			26		7	W 16	-	-
13982	2		11		15	18	-	-
13983	2				7	40	-	-
13984	2		11		40	18	-	-
13985	2		3		15	W 16	-	-
13991	2		9		15	W 35	-	-
13993	1		2		17		-	-
13995	2		9		17	40	-	-
14000	2	W 30		W 22		40	-	-
14001	2				5	7	-	-
14003	2	W 32			12	W 21	-	+
14004	2				7	W 22	-	-
14005	2		26		7	W 21	-	-
14006	3		29		12	18	+	+
14013	1		2		12	W 41	+	+
14014	2		3	W 35		40	-	-
14015	1		3		40	W 41	-	-
14017	1		3		40		-	-
14018	1		2	W 41		W 35	-	-
14024	2		3		7	40	-	-
14025	2				7		-	-
14026	2				7	40	-	-
14027	2				7	40	-	-
14020	1		2		8	12	+	+
14021	2			W 16			-	-
14022	1		2		8	W 16	-	-
14028	2		3		15	40	-	-
14029	2			W 37			-	-

4. PBL als Testzellen, untersucht nur mit dem Antiserum 6 in der Verdünnung 1:8

PBL Nr.	HLA - Phänotyp				Antiserum 6 1:8
13606	1	2	7	15	-
13607	2	3	5		-
13608	2	9	5	W 22	-
13609	1	9	W 35	W 37	-
13610	1	2	17	W 35	-
13611	1	29	8	12	+
13614	2	10	5	18	-
13615		3	5	40	-
13618	9		27	W 16	-
13619	2	9	40	W 16	-
13620	2	28	14	15	-
13621	3	W 30	7	13	-
13627	2	W 30	12	W 21	-
13628	3	W 30	27	15	-
13630	2	3	15	27	-
13632	2	W 30	15	27	-
13633	1	W 30	8	27	-
13634	1	3	7	15	-
13635	2	28	15	W 39	-
13636	2	3	15	27	-
13637	1	3	8	27	-
13638	1	3	8	27	-
13639	2	29	7	15	-
13640	2	28	W 21	40	-
13641	1	8	9	W 37	-
13645	1	2	8	12	+
13646	1		8		-
13647	1	2	8	12	+
13648	1	2	8	12	+
13649	2	3	13	27	+
13650	1	W 33	8	14	-
13651	1	2	8	13	+
13652	1	3	8	27	-
13653	1		7	8	-
13654	1	2	8	W 35	-
13656	1		8		-
13667	3	W 33	17	40	-
13673	1	29	8	27	-
13674	2		7	15	-
13675	2	9		15	-
13680	1	9	7	8	-
13684		26		W 39	-
13685	2	11	12	40	+

PBL Nr.	HLA - Phänotyp				Antiserum 6 1:8
13686	10	11	12	40	+
13687	2		7	40	-
13688	W 30	W 33	7	14	-
13689	2		8	18	-
13690	W 32	W 33	14	W 35	-
13691	29	W 33	12	14	+
13692	25	28	14	18	-
13698	2	W 32	18	W 22	-
13693	1	11	5	18	-
13697	1	11	5	8	-
13699	1	2	8	18	-
13700	2	11	5	18	-
13694	1	10		27	-
13695	1	1	5	27	+
13696	1	1	5	27	-
13701	9	W 33	13	14	-
13702	9	W 33	17	W 35	-
13703	9	W 33	13	W 35	+
13704	9	W 33	13	W 35	+
13712	2	W 33	15	27	-
13713	W 23	29	W 21	W 22	-
13714	1	2	8	18	-
13715	1	10	8	12	+
13718	1	9	W 38	W 35	-
13719	3	11	12	14	+
13720	1	3	W 16	14	-
13721	1	3	W 16	14	-
13722	1	W 24	5	8	-
13723	1	W 23	8	12	+
13724	1	W 23	8	12	+
13725	1	W 23	8	12	+
13716	1		8		-
13717	1		8		-
13731	2		12	W 21	+
13732	1	2	8	13	-
13733	2	11	W 35	40	-
13629	2	W 30	27	27	-
13655	2	3	7	W 35	-

Bewertung: 2-4 fach positiv = +

1 fach positiv und negativ = -

nicht getestet = .

LITERATURVERZEICHNIS

1. LAMM, L.U., F. KISSMEYER-NIELSEN, A. SVEJGAARD, G. BRUNN PETERSEN, E. THORSBY, W. MAYR und C. HØGMAN: On the orientation of the HL -A region and the PGM_3 locus in the chromosome. Tissue Antigens 2 (1972) 205-214

2. VAN SOMEREN, H., A. WESTERVELD, A. HAGEMEIJER, J.R. MEES und P. KHAN: Human antigen and enzyme markers in man-Chinese hamster somatic cell hybrids: evidence for synteny between the HL-A, PGM_3, ME_1 and IPO-B loci. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 (1974) 962-965

3. SNELL, G.D.: Immunogenetics: retrospect and prospect Immunogenetics 1 (1974) 1-3

4. BURNET, F.M.: Immunological recognition of self. Science 133 (1961) 307

5. CEPPELLINI, R.: Old and new facts and speculations about transplantation antigens of man. Progress in Immunol. ed.: AMOS, D.B., N.Y. Academic (1971) S. 973-1025

6. THORSBY, E.: The human major histocompatibility system. Transplant. Rev. 18 (1974) 51-128

7. SVEJGAARD, A.: HLA factors and immune function. Acta endocrinol. (suppl.) 83, suppl. 205 (1976) 77-84

8. BACH, F.H., M.L. BACH, O.J. KUPERMAN, H.U. SOLLINGER und P.M. SONDEL: Cellular recognition of major histocompatibility complex antigens. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1977) Bd. 41, S. 429

9. GÖTZE, D.:
The major histocompatibility system in man and animals.
ed.: GÖTZE, D., Springer Verlag (1977) S. 1-6

10. DEGOS, L. und J. COLOMBANI:
Biological role of the HLA system.
in: HLA System-New Aspects, ed.: FERRARA, G.B., Amsterdam, North-Holland (1977) S. 21-30

11. KLEIN, J.:
Biology of the mouse histocompatibility-2 complex.
Springer Verlag(1975)

12. LITTLE, C.C.:
A possible Mendelian explanation for a type of inheritance apparently non-Mendelian in nature.
Science 40 (1914) 904-906

13. SNELL, G.D. und J.H. STIMPFLING:
Genetics of tissue transplantation.
in: Biology of the laboratory mouse,
ed.: GREEN, E.L., N.Y. MC GRAW-HILL (1966) S. 457-491

14. AMOS, D.B. und F.E. WARD:
Immunogenetics of the HLA-system.
Physiol. Rev. 55 (1975) 206-246

15. DAUSSET, J.:
Leuco-agglutinis. IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion.
Vox. Sang. 4 (1954) 190-198

16. MIESCHER, P. und M. FAUCONNET:
Mise en evidence de different groupes leucocytaires chez l'homme.
Schweiz. Med. Wschr. 84 (1954) 597-599

17. DAUSSET, J.:
Iso-leuco-anticorps.
Acta Haematol. 20 (1958) 156-166

18. VAN ROOD, J.J.:
Leucocyte Grouping (Thesis)
Leiden: University of Leiden (1962)

19. PAYNE, R., M. TRIPP, J. WEIGLE, W. BODMER und J. BODMER:
A new leucocyte isoantigen system in man.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 29 (1964) 285-295

20. DAUSSET, J., P. IVANYI und D. IVANYI:
Tissue alloantigens in human: identification of a complex system (Hu-1).
in: Histocompatibility Testing 1965, ed.: BALNER, H. et al. Copenhagen Munksgaard (1965) S. 51-62

21. KISSMEYER-NIELSEN, F., A. SVEJGAARD und M. HAUGE:
Genetics of the human HL-A transplantation system.
Nature 219 (1968) 1116-1119

22. KISSMEYER-NIELSEN, F., A. SVEJGAARD, S. AHRONS und L. STAUB-NIELSEN:
Crossing over within the HL-A system.
Nature (Lond.) 224 (1969) 75-76

23. SVEJGAARD, A., M. HAUGE und F. KISSMEYER-NIELSEN:
HL-A haplotype frequencies in Denmark and Norway.
Tissue Antigens 1 (1971) 184-195

24. SANDBERG, L., E. THORSBY, F. KISSMEYER-NIELSEN und A. LINDHOLM:
Evidence of a third sublocus within the HL-A chromosomal region.
in: Histocompatibility Testing 1970, ed.: TERASAKI, BALTIMORE, WILLIAMS und WILKINS (1970) S. 165-169

25. LÖW, B., L. MESSETER, S. MANSSON und T. LINDHOLM:
Crossing-over between the SD-2(Four) and SD-3 (AJ) loci of the human histocompatibility chromosomal region.
Tissue Antigens 4 (1974) 405

26. MEMPEL, W., H. GROSSE-WILDE, P. BAUMANN, B. NETZEL, J. STEINBAUER-ROSENTHAL, S. SCHOLZ, J. BERTRAMS und E.D. ALBERT:
Population genetics of the MLC response: Typing for MLC determinants using homozygous and heterozygous reference cells.
Transpl. Proc. 5 (1973) 1529-1534

27. AMOS, D.B. und F.H. BACH:
Phenotypic expression of the major histocompatibility locus in man (HL-A): leukocyte antigens and mixed leukocyte culture reactivity.
J. Exp. Med. 128 (1968) 623-637

28. BACH, F.H., R.J. ALBERTINI, D.B. AMOS, R. CEPPELLINI, P. MATTIUZ und V.C. MAGGIANO:
Mixed leukocyte culture studies in families with known HL-A genotypes.
Transplant. Proc. 1 (1969) 339-341

29. PLATE, J.M., F.E. WARD und D.B. AMOS:
The mixed leukocyte culture response between HL-A identical siblings.
Histocompatibility Testing, 1970, ed.: TERASAKI, BALTIMORE, WILLIAMS und WILKINS (1970) S. 531

30. EIJSVOOGEL, V.P., J.J. VAN ROOD, E.D. DU TOIT und P.T. SCHELLEKENS:
Position of a locus determing mixed lymphocyte reaction distinct from the known HL-A loci.
Europ. J. Immunol. 2 (1972) 413-418

31. REISFELD, R.A., J.P. ALLISON, S. FERRONE, M.A. PELLEGRINO und M.D. POULIK:
HL-A antigens in serum and urine: isolation, characterization and immunogenic properties.
Transplant. Proc. 8 (1976) 173-178

32. STROMINGER, J.L., P. CRESSWELL, H. GREY, R.E. HUMPHREYS, D. MANN, J. MC CUNE, P. PARHAM, R. ROBB, A.R. SANDERSON, T.A. SPRINGER, C. TERHORST und M.J. TURNER:
The immunoglobulin-like structure of human histocompatibility antigens.
Transplant. Rev. 21, (1974) 126-143

33. PETERSON, P., B.A. CUNNINGHAM, L. BERGGARD und G.M. EDELMAN:
$ß_2$-Microglobulin- a free immunoglobulin domain.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (1972) 1697-1701

34. SMITHIES, O. und M.D. POULIK:
Initiation of protein synthesis at an unusual position in an immunoglobulin gene.
Science 175 (1972) 187-189

35. GOODFELLOW, P.N., E.A. JONES, V. VAN HEYNINGEN, E. SOLOMON, M. BOBROW, V.C. MIGGIANO und W. BODMER:
The $ß_2$-m gene is on chromosome 15 and not in the HLA region.
Nature 254 (1975) 267-269

36. WERNET, P. und H.G. KUNKEL:
Immunochemical aspects of Ia type B cell membrane specificities (HL-B) as candidates for a human MLC stimulator antigen system. Molecular heterogeneity and distinction from the Fc receptor.
in: Histocompatibility Testing(1975), ed.: KISSMEYER-NIELSEN, F., Copenhagen Munksgaard (1975) S. 731-734

37. APPELLA, E., M. ROGERS und L.W. LAW:
Biochemical and biological properties of histocompatibility antigens and tumor specific transplantation antigens.
in: HLA System - New Aspects, ed. FERRARA, G.B., Amsterdam, North-Holland (1977) S. 31-43

38. PAYNE, R. und M.R. ROLFS:
Fetomaternal leukocyte incompatibility.
J. Clin. Invest. 37 (1958) 1756-1763

39. VAN ROOD, J.J., J.G. EERNISSE und A. VAN LEEUWEN:
Leucocyte antibodies in sera from pregnant women.
Nature 181 (1958) 1735-1736

40. TERASAKI, P.I., M.R. MICKEY, J.N. YAMAZAKI und D. VREDEVOE:
Maternal-fetal incompatibility. I. Incidence of HLA antibodies and possible association with congenital anomalies.
Transplantation 9 (1970) 538-543

41. ROBERT, M., H. BETUEL und J.P. REVILLARD:
Inhibition of mixed lymphocyte reaction by sera from multipara.
Tissue Antigens 3 (1973) 39-56

42. CEPPELLINI, R., G.D. BONNARD, F. COPPO, V.C. MIGGIANO, M. POSPISIL, E.S. CURTONI und M. PELLEGRINO:
Mixed leukocyte culture and HL-A antigens. I. Reactivity of young fetuses, newborns and mother at delivery.
Transplant. Proc. 3 (1971) 58-63

43. FERRARA, G.B., G.R. TORSI, G. AZZOLINA, G. GARMINATI und A. LONGO:
Production of isoantisera for HL-A typing by planned immunization. A four-year's experiment.
in: Symp. Ser. Immunobiol. Standardization. Intern. Symp. HL-A Reagents 1972, Basel: KARGER (1973) Bd. 18, S. 20-26

44. COLOMBANI, J., M. COLOMBANI, L. DEGOS, G. TERRIER, Y. GAUDY und H. DASTOT:
Effect of cross-reactions on HL-A antigen immunogenicity.
Tissue Antigens 4 (1974) 136-145

45. LEGRAND, L. und J. DAUSSET:
The complexity of the HL-A gene product.
I. Study of a serum produced against HL-A 5 in an HL-A semi-identical situation.
Tissue Antigens 4 (1974) 329-345

46. RODEY, G.E., B. STURM und R.H. ASTER:
Cross-reactive HL-A antibodies. Separation of multiple HL-A specificities by platelet adsorption and acid elution.
Tissue Antigens 3 (1973) 63-69

47. MITTAL, K.K. und P.I. TERASAKI:
Serological cross-reactivity in the HL-A system.
Tissue Antigens 4 (1974) 146-156

48. MITTAL, K.K.:
Cross-reactivity of monospecific anti-HL-A antisera.
Vox Sang. 29 (1975) 418-432

49. LANDSTEINER, K. und P. LEVINE:
On individual differences in human blood.
J. exp. Med. 47 (1928) 757-775

50. LANDSTEINER, K. und A. S. WIENER:
Studies on agglutinogen (Rh) in human blood reacting with antirhesus sera and with human iso-antibodies.
J. exp. Med. 74 (1941) 309-320

51. BRUTEL A.DE LA RIVIERE, P.P. VERHOEF-KARSSEN, A.E.G. K. VON DEM BORNE und C.P. ENGELFRIET:
A comparative study of the production of antibodies against human blood cells in animals of various species
Scand. J. Immunol. 6 (1977) 349-356

52. METZGAR, R.S. und J.L. MILLER:
Production of HLA specific antibodies in monkeys by immunization with soluble HLA antigens.
Transplantation 13 (1972) 467-471

53. SANDERSON, A.R. und K.L. WELSH:
HL-A -specific antibodies by immunization of Macaca Irus (Cynomologous) monkeys with purified HL-A substances.
Transplant. Proc. 5 (1973) 471-475

54. BATCHCLOR, J.R. und A.R. SANDERSON:
HL-A substances: properties and immunization of rabbits.
Transplant. Proc. 1 (1969) 489-490

55. THORSBY, E.:
Cell specific and common antigens on human granulocytes and lymphocytes demonstrated with cytotoxic hetero-antibodies.
Vox Sang. 13 (1967) 194-206

56. SHULMAN, N.R., V.J. MARDER, M.C. HILLER und E.M. COLLIER:
Platelet and leukocyte isoantigens and their antibody: serologic, physiologic and clinical studies.
Prog. Hemat. 4 (1964) 222-301

57. EINSTEIN, A.B., D.L. MANN, H.G. GORDON, R.J. TRAPANI und J.L. FAHEY:
Heterologous antisera against specific HL-A antigens.
Transplantation 12 (1971) 299-304

58. FERRONE, S., P.G. NATALI, A. HUNTER, P.I. TERASAKI und R.A. REISFELD:
Immunogenicity of soluble HLA alloantigens.
J. Immunol. 108 (1972) 1718-1722

59. GÖTZE, D., S. FERRONE und R.A. REISFELD:
Serologic cross-reactivity between H-2 and HL-A antigens. I. Specific reactivity of rabbit anti HL-A sera against murine cells.
J. Immunol. 109 (1972) 439-450

60. MIYAKAWA, Y., N. TANIGAKI, Y. YAGI und D. PRESSMANN:
Common antigenic structure of HL-A antigens. I. Antigenic determinants recognizable by rabbits on papain-solubilized HL-A molecular fragments.
Immunology 24 (1973) 67-76

61. STAINES, N.A., G.J. O'NEILL, K. GUY und D.A.L. DAVIES:
Xenoantisera against lymphoid cells: specificity and use in monitoring purification of mouse and human histocompatibility antigens.
Tissue Antigens 3 (1973) 1-21

62. THIEME, T.R. und B.W. COLOMBE:
Membrane antigens characteristic of human lymphoid cells in established cultures.
Tissue Antigens 4 (1974) 210-217

63. ROBB, R.J., R.E. HUMPHREYS, T.C. FULLER, D.L. MANN und J.L. STROMINGER:
Rabbit anti HL-A 2 sera.
Transplantation 19 (1975) 445-447

64. CRESSWELL, P. und J.L. AYRES:
HLA antigens: rabbit antisera reacting with all A series or all B series specificities.
Europ. J. Immunol. 6 (1976) 82-88

65. BILLING, R.J. und P.I. TERASAKI:
Rabbit antisera to HL-A 9 isolated from normal serum.
Transplantation 17 (1974) 231-234

66. FERRONE, S., M.A. PELLEGRINO, R. BILLING, P.I. TERASAKI und R.A. REISFELD:
Production of anti-W 24-xenoantisera in rabbits.
Tissue Antigens 5 (1975) 41-47

67. FERRONE, S., K.K. MITTAL, M.A. PELLEGRINO, J.P. ALLISON und R.A. REISFELD:
Immunogenicity of HLA antigens purified from serum.
Transplantation 23 (1977) 7-15

68. ALLISON, J.P., S. FERRONE, M.A. PELLEGRINO und R.A. REISFELD:
Procedure for the selection of HLA xenoantisera for immunochemical characterization of HLA antigens.
Transplant. Proc. 9 (1977) 601-604

69. MILLER, G. und M. LIPMAN:
Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 (1973) 190-194

70. BÖYUM, A.:
Separation of leukocytes from blood and bone marrow.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 21 Supp. 97 (1968) 31-50

71. JONDAL, M., G. HOHN und H. WIGZELL:
Surface markers on human T and B lymphocytes. 1. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells.
J. exp. Med. 136 (1972) 207-215

72. MITTAL, K.K., M.R. MICKEY, D.P. SINGAL und P.I. TERASAKI:
Serotyping for homotransplantation. XVIII. Refinement of microdroplet lymphocyte cytotoxic test.
Transplantation 6 (1968) 913-927

73. TERASAKI, P.I., D. BERNOCO, S. PARK, G. OZTURK und Y. IWAKI:
Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens.
Am. J. clin. Pathol. 69 (1978) 103-120

74. LIENERT, G.A.:
Verteilungsfreie Methoden in der Biostastik.
Verlag A. Hain, Meisenheim (1962)

75. BODMER, W.F., J. BODMER, D. IHDE und S. ADLER:
Genetic and serological association analysis of the HLA leukocyte system.
Computer applications in genetics, ed.: MORTEN, N.E.
Univ. Hawai Press Honolulu (1969) S. 117-128

76. LEPAGE, V., L. DEGOS und J. DAUSSET:
Descriptive serological analysis.
Tissue Antigens 5 (1975) 301

77. SELWOOD, N.H.:
Detailed numerical analysis of serological data from the 5th intern. histocompatibility workshop.
Tissue Antigens 5 (1975) 367-385

78. BELVEDERE, M., P. MATTIUZ und E.S. CURTONI:
An antibody cross-reacting with LA and FOUR antigens of HLA-system.
Immunogenetics 1 (1975) 538-548

79. RICHIARDI, P., E.S. CURTONI, A. PIAZZA und P.L. MATTIUZ:
Identification of two determinants included in "antigen" HLA-10 (To 31 and To 40) and of an new family of cross-reacting specificities (HLA-1, 11, To 30, 31, 40).
Tissue Antigens 1 (1971) 162-170

80. ALLEN, F., D.B. AMOS, R. BATCHELOR, W. BODMER, R. CEPPELLINI, J. DAUSSET, C. ENGELFRIET, M. JEAUNET, F. KISSMEYER-NIELSEN, P. MORRIS, R. PAYNE, P.I. TERASAKI, J.J. VAN ROOD, R. WALFORD, C. ZMIJEWSKI, E. ALBERT, P. MATTIUZ, M.R. MICKEY und A. PIAZZA:
Joint report of 4th international histocompatibility workshop.
in: Histocompatibility Testing 1970, Munksgaard Copenhagen (1970) S. 17-47

81. CEPPELLINI, R., E.S. CURTONI, P.L. MATTIUZ, V. MAGGIANO, G. SCUDELLER und A. SERRA:
Genetics of leucocyte antigens: a family study of segregation and linkage.
in: Histocompatibility Testing 1967, Munksgaard Copenhagen (1967) S. 149-185

82. DAUSSET, J., P. IVANYI und D. IVANYI:
Tissue alloantigens in humans: identification of a complex system (Hu-1).
in: Histocompatibility Testing 1965, Munksgaard Copenhagen (1965) S. 51-62

83. MICKEY, M.R., D.P. SINGAL und P.I. TERASAKI:
Serotyping for homotransplantation. XXVI. Evidence for 3 HL-A subloci.
Transplant. Proc. 1 (1969) 347-351

84. AMOS, D.B., G. CABRERA, W.B. BIAS, J.M. MC QUEEN, S.L. LANCASTER, J.G. SOUTHWORTH und F.E. WARD:
The inheritance of human leucocyte antigens. III. The organization of specificities.
in: Histocompatibility Testing 1970, Munksgaard Copenhagen (1970) S. 259-276

85. BATCHELOR, J.R. und B.A. CHAPMAN:
Absorption analysis of cytotoxic human isoantisera.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 129 (1966) 529-540

86. BODMER, J.G. und W.F. BODMER:
Studies on African Pygmies. IV. A comparative study of the HL-A polymorphism in the Babinga Pygmies and other African and Caucasoid populations.
Am. J. human Gen. 22 (1970) 396-411

87. ENGELFRIET, C.P., E. VEENHOVEN VON RIESZ, M. KORT-BAKKER und P.M. VAN DEN BERG-LOONEN:
Some studies with anti-4c, anti-R, anti-HL-A 5, anti-W 5, W 18 and the description of a new antigen of the four segregant series, called HR.
in: Histocompatibility Testing 1972, Munksgaard Copenhagen (1972) S. 475-478

88. MORRIS, P.J., A. TING und P. KINCAID-SMITH:
Leukocyte antigens in renal transplantation. X. A clinical and histological evaluation of matching for HL-A in cadaver renal transplantation.
in: Histocompatibility Testing, Munksgaard Copenhagen (1970) S. 371-380

89. PAYNE, R., J. BODMER, W. BODMER und E. SHANBROM:
Characterization of HL-A antisera produced by planned immunization.
in: Histocompatibility Testing, Munksgaard Copenhagen (1970) S. 207-220

90. THORSBY, E. und F. KISSMEYER-NIELSEN:
HL-A antigens and genes. III. Production of HL-A typing antisera of desired specificity.
Vox Sang. (Basel) 17 (1969) 102-111

91. W.H.O. Terminology Report
in: Histocompatibility Testing, Munksgaard Copenhagen (1972) S. 2-6

92. ALBERT, E., D.B. AMOS, W.F. BODMER, R. CEPPELLINI, J. DAUSSET, F. KISSMEYER-NIELSEN, W. MAYR, R. PAYNE, J.J. VAN ROOD, P.I. TERASAKI, Z. TRNKA und R.L. WALFORD:
W.H.O. Nomenclature 1977
Tissue Antigens 11 (1978) 81-86

93. OH, J.H. und L.D. MACLEAN:
Comparative immunogenicity of HL-A antigens: a study in primaparas.
Tissue Antigens 5 (1975) 33-37

94. EGURO, S.Y., M.E. DORF und D.B. AMOS:
Cross-reactions of HL-A antibodies. VI. Discussion of a complex serum.
Tissue Antigens 3 (1973) 195-203

95. TERHORST, C., P. PARHAM, D. MANN und J.L. STROMINGER:
Structure of HLA antigens: aminoacid and carbohydrate compositions and NH_2-terminal sequences of four antigen preparations.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (1976) 910-914

96. HOOD, L. und J. SILVER:
The structure and evolution of transplantation antigens.
in: The immune system, 27 Colloquium Mosbach 1976, Springer 1976, ed.: MELCHERS, F. und K. RAJEWSKY (1976) S. 220-234

97. BODMER, J., E.S. CURTONI, A. VAN LEEUWEN, M.R. MICKEY, L. KIERBYE, L. DEGOS, M.C. BOTHA, E. WOLF, W.R. MAYR, L. STAUB-NIELSEN und A. PIAZZA:
The ABC of HLA. A serological report of the 6th Histocompatibility Testing Workshop.
in: Histocompatibility Testing, Munksgaard Copenhagen (1975) S. 21-99

98. LAMM, L. U. und T. KRISTENSEN:
Formal genetics of the HLA system.
in: HLA System-New Aspects, ed.: FERRARA, G.B., Amsterdam, North-Holland (1977) S. 1-20

99. VLADUTIU, A.O. und N.R. ROSE:
HL-A antigens: association with disease.
Immunogenetics 1 (1974) 305-328

100. PIAZZA, A.:
An inclusion analysis for studying HL-A specificities.
Tissue Antigens 5 (1975) 442-463

101. BODMER, J.G., W. BODMER und A. PIAZZA:
Inclusion analysis of fifth histocompatibility testing workshop sera in 25 populations.
Tissue Antigens 5 (1975) 315-366

102. BODMER, J., A. COUKELL, W. BODMER, R. PAYNE und E. SHANBROM:
A new allele for the LA series of HL-A antigens: the analysis of a complex serum .
in: Histocompatibility Testing, Munksgaard Copenhagen (1970) S. 175-185

103. ALBRECHTSEN, D., A. BRATLIE, H. NOUSIAINEN, B.G. SOLHEIM, N. WINTHER und E. THORSBY:
Serological typing of HLA-D: predictive value in mixed lymphocyte culture (MLC).
Immunogenetics 6 (1978) 91-100

104. ROOD, v. J.J. und A. VAN LEEUWEN:
Leucocyte grouping. A method and its application.
J. clin. Invest. 42 (1963) 1382-1390

105. DUQUESNOY, R.J.:
Approach to a molecular model for HLA antigenicity.
in: Histocompatibility Testing, Munksgaard Copenhagen (1970) S. 747-751

106. EDWARDS, P.A., H.W. KUNZ und T.J. GILL:
Genetic studies in inbred rats. VIII. The production of xenoantisera against Ag-B histocompatibility antigens.
J. Immunogenetics 4 (1977) 53-60

107. CRESSWELL, P. und S.S. GEIER:
Antisera to human B lymphocyte membrane glycoproteins block stimulation in mixed lymphocyte culture.
Nature 257 (1975) 147-149

108. ALBRECHTSEN, D.:
HLA-D-associated "Ia-like" antigens on human macrophages.
Scand. J. Immunol. 6 (1977) 907-912

109. GOODFELLOW, P., C. BARNSTABLE, E. JONES, W.P. BODMER, M. J. CRUMPTON und D. SNARY:
Production of specific antisera to human B lymphocytes.
Tissue Antigens 7 (1976) 105-117

110. ALBRECHTSEN, D., B.G. SOLHEIM und E. THORSBY:
Human Ia-like antigens associated with HLA-D.
Scand. J. Immunol. 6 (1977) 419-425

111. ALBERT, E.D., A. ANDREAS, A. MC NICHOLAS, S. SCHOLZ und B. KUNTZ:
B- and T-cell-specific alloantigens in man.
Scand. J. Immunol. 6 (1977) 426

112. SNARY, D., C. BARNSTABLE, W.F. BODMER, P. GOODFELLOW und M.J. CRUMPTON:
Human Ia antigens. Purification and molecular structure.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Bd. 41 (1977) S. 379-386

113. SPRINGER, T.A., J.F. KAUFMAN, C. TERHORST und J.L. STROMINGER:
Purification and structural characterization of human HLA-linked B-cell antigens.
Nature 268 (1977) 213-218

114. SPRINGER, T.A., J.F. KAUFMAN, L.A. SIDDOWAY, M. GIPHART, D.L. MANN, C. TERHORST und J.L. STROMINGER:
Chemical and immunological characterization of HL-A linked B-lymphocyte alloantigens.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Bd. 41 (1977) 387-396

115. SPRINGER, T.A., J.F. KAUFMAN, L.A. SIDDOWAY, D.L. MANN und J.L. STROMINGER:
Purification of HLA-linked B lymphocyte alloantigens in immunologically active form by preparative sodium dodecyl sulfate - gel electrophoresis and studies on their subunit association.
J. Biol. Chem. 252 (1977) 6201-6207

116. MC CUNE, J.M., R.E. HUMPHREYS, R.R. YOCUM und J.L. STROMINGER:
Enhanced representation of HL-A antigens on human lymphocytes after mitogenesis induced by phythem-agglutinin or Epstein-Barr virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. 72 (1975) 3206-3209

117. STROMINGER, J.L., D.L. MANN, P. PARHAM, R. ROBB, T. SPRINGER und C. TERHORST:
Structure of HL-A and B antigens isolated from cultured human lymphocytes.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Bd. 41 (1977) S. 323-330

118. DICK, H.M., W.F. BODMER, J.G. BODMER, C.M. STEEL, W.B. CRICHTON und J. EVANS:
HL-A typing of lymphoblastoid cell lines.
in: Histocompatibility Testing, Munksgaard Copenhagen (1975) S. 671-675

119. PETERSON, P.A. H. ANUNDI, B. CURMAN, L. KLARESKOG, S. KVIST, L. ÖSTBERG, L. RASK, L. SANDBERG und K. SEGE:
Structural studies of $ß_2$-m-associated and other MHC antigens.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Bd. 41 (1977) 331-339

120. MITTAL, K.K., S. FERRONE, M.R. MICKEY, M.A. PELLEGRINO, R.A. REISFELD und P.I. TERASAKI:
Specificity of lymphocytotoxic anti-human antibodies in normal rabbit sera.
Tissue Antigens 3 (1973) 88-94

121. ALBERT, E.D., M.R. MICKEY und P.I. TERASAKI:
A new approach to cross-reactivity in the HL-A system.
Intern. Symp. on Stand. of HL-A reagents, Copenhagen 1972, Series immunobiol. Stan. 18, 156-164 , Karger, Basel 1973

122. ALBERT, E.D., M.R. MICKEY und P.I. TERASAKI:
Genetics of the HL-A system in four populations: Caucasians, Japanese, American Negroes and Mexican Americans.
Histocompatibility Testing 1972, Munksgaard Copenhagen (1972) S. 233-340

123. LEGRAND, L. und J. DAUSSET:
The complexity of the HL-A gene product. II. Possible evidence for a "public" determinant common to the first and second HL-A series.
Transplantation 19 (1975) 177-180

124. KISSMEYER-NIELSEN, F. und E. THORSBY:
Human transplantation antigens.
Transplant. Rev. 4 (1970) 1-176

125. MUELLER-ECKHARDT, C., D. HEINRICH und V. ROTHENBERG:
Frequency and complexity of cross-reactive HL-A antibodies. Elution studies with platelets.
Intern. Symp. on Stand. of HL-A reagents, Copenhagen 1972, Symp. Series immunobiol. Stand. 18, 171-178, Karger, Basel 1973.

126. ALBERT, E.D., S. SCHOLZ, I. ROSENTHAL, H. BALTIN und J. BERTRAMS:
Study of the HL-A system in the Turkish and German populations.
Histocompatibility Testing 1972, Munksgaard-Copenhagen (1973) S. 147-152

127. GÖTZE, D. und R.A. REISFELD:
Soluble murine transplantation antigens.
II. Immune response to H-2k^{d} antigens.
Z. Immunitätsforsch. 148 (1974) 45-61